



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

KAROLINE MIRELLA SOARES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *in vitro* DE PEPTÍDEOS OBTIDOS DO LEITE DE
JUMENTAS NORDESTINAS (*Equus asinus*) FERMENTADO POR
*Lactobacillus rhamnosus***

**RECIFE – PE
2020**

KAROLINE MIRELLA SOARES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *in vitro* DE PEPTÍDEOS OBTIDOS DO LEITE DE
JUMENTAS NORDESTINAS (*Equus asinus*) FERMENTADO POR
*Lactobacillus rhamnosus***

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biociência
Animal da Universidade Federal Rural de
Pernambuco para obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Meire dos Santos Falcão de Lima

RECIFE – PE
2020

KAROLINE MIRELLA SOARES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *in vitro* DE PEPTÍDEOS OBTIDOS DO LEITE DE
JUMENTAS NORDESTINAS (*Equus asinus*) FERMENTADO POR
*Lactobacillus rhamnosus***

**Dissertação de Mestrado defendida e aprovada pela
BANCA EXAMINADORA**

Data da aprovação: 18 de fevereiro de 2020

Profa. Dr^a. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares – Presidente/Orientadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco– UFRPE

Prof. Dr^a. Ana Lucia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco– UFRPE

Dr. Adriano Nunes Cunha
Instituto de Tecnologia de Pernambuco - ITEP/PE

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus pela vida, por todos os acontecimentos que se apresentaram, cada um deles, ao seu modo, me fizeram ter mais fé e perseverança.

À minha família, que me deu a base para eu conseguir concretizar mais uma etapa de crescimento pessoal. Apesar das dificuldades, sempre me apoiou e disponibilizou os melhores meios e condições para que eu aproveitasse todas as oportunidades.

Ao Sr. Tercio Cavalcanti, pela disposição em ajudar realizando com muita boa vontade a ordenha do leite de jumenta, para o desenvolvimento da pesquisa.

À minha orientadora, Prof.^a Dr^a Maria Taciana Cavalcanti, que me orientou desde a iniciação científica... e novamente, é muito difícil conseguir organizar as palavras capazes de expressar minha gratidão, independente dos acontecimentos “BONS” e “RUINS”. Acho que não tenho condições de me expressar literalmente. – Sei que agradeço imensamente sua dedicação ao meu lado em cada etapa desta dissertação, assim como a ENORME paciência.

À Meire Falcão, minha coorientadora, que me norteou desde a iniciação científica e durante o desenvolvimento dessa pesquisa, colaborando não só nos aspectos acadêmicos, mas também nos pessoais. - Apesar de tudo... sobrevivemos!

À Prof.^a Ana Porto, por disponibilizar o Laboratório de Tecnologia de Bioativos - LABTECBIO e todos os meios necessários para a concretização desta pesquisa.

Aos colegas do LABTECBIO e CENAPESQ que tornam os laboratórios, além de um local de experimentos, um local mais alegre com descontração e boas risadas.

À Prof.^a Tania Sarmiento por aceitar a parceria e desvendar os mistérios químicos do leite de jumenta, assim como sua paciência e disponibilidade laboratorial. Aos colegas do Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica - LABIOFITO que me auxiliaram em todos os procedimentos necessários em relação a espectrometria de massas: Ayala Pereira (Dominadora de HPLC) ou simplesmente “Linda” por todo apoio acadêmico e pessoal, sou muito grata pela sua amizade. Ao Hélder e Amanda por suportarem meus “chiliques”, e pelo auxílio na tradução da linguagem cromatográfica, e ao Rogelio Moreno por toda sua dedicação nas interpretações e ensinamentos durante o processo de identificação dos peptídeos.

Agradeço também aos demais amigos: à Andressa por toda paciência e cumplicidade e ao Yago por todo seu auxílio e amizade.

À Capes pela bolsa concedida que proporcionou a minha dedicação total aos estudos e à pesquisa.

Em suma, a todos que colaboraram para concretização dessa etapa.

Muito obrigada!

RESUMO

Leite e derivados contêm uma elevada quantidade de proteínas, servindo como fonte de peptídeos bioativos que podem influenciar de forma benéfica à saúde do consumidor após serem liberados através de processos fermentativo e/ou enzimático. O objetivo deste trabalho foi analisar peptídeos obtidos do leite de jumenta (*Equus asinus*) pasteurizado e fermentado por *Lactobacillus rhamnosus* utilizando espectrometria de massas e avaliação *in vitro* de seu potencial bioativo como ação antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensivo e citotoxicidade. O leite obtido de jumenta foi pasteurizado e fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*, resultando no leite pasteurizado e o leite fermentado. Após a fermentação, os extratos foram centrifugados e o sobrenadante submetido ao processo de digestão *in vitro* resultando em leite pasteurizado digerido e leite fermentado digerido. Essas amostras foram respectivamente submetidas a ultrafiltração utilizando frações menores de 3 kDa. A análise de LC-MS/MS dos peptídeos foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a um espectrômetro de massas Quadrupolo-ToF. A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método CIM (concentração inibitória mínima) frente às cepas patogênicas Gram positivas e negativas; atividade antioxidante foi realizada por ABTS e DPPH; a atividade anti-hipertensiva foi mensurada através da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), e a citotoxicidade utilizando as linhagens celulares J774.A1 (macrófagos), MDA-MB-231 (adenocarcinoma humano da glândula mamária) e S-180 (linhagem heterogênea de células de tumor de camundongos de origem mesodérmica). O perfil químico das amostras leite pasteurizado e leite pasteurizado digerido apresenta semelhança com o perfil químico das amostras do leite fermentado e leite fermentado digerido, de acordo com a análise dos cromatogramas dos íons pico base obtidos tanto no modo positivo quanto negativo, permitiu identificar os dez principais peptídeos nas amostras após digestão *in vitro*. Os resultados da atividade antimicrobiana do leite pasteurizado e leite fermentado apresentaram inibição contra todas as cepas patogênicas, e no leite pasteurizado digerido ocorreu apenas a inibição das cepas Gram-positivas, e o leite fermentado digerido à inibição foi dependente da concentração padronizada para *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. A ação antioxidante por ABTS dos extratos peptídicos apresentaram melhor atividade após digestão, leite pasteurizado digerido com 1348,39 e o leite fermentado digerido 1373,77 mM de Trolox/100 mL, já para o ensaio por DPPH apresentou melhor inibição com leite fermentado digerido 75,86 mM de Trolox/100 mL. Nos ensaios da atividade anti-hipertensiva, os melhores resultados foram com leite pasteurizado digerido IC_{50} 10,81 $\pm$ 1,4 mg/mL, que elevou a inibição da ECA ao diminuir sua concentração peptídica, e com leite fermentado IC_{50} 8,23 $\pm$ 1,23 mg/mL. Os peptídeos presentes na amostra do leite pasteurizado em todas as concentrações usadas e todas as células de macrófagos (J774.A1) foram inócuos, com viabilidade celular maior que 80%. Em relação a amostra do leite pasteurizado digerido, a partir de 100 μ g/mL foi tóxica para a linhagem celular MDA-MB-231, e a partir de 200 μ g/mL apresentou toxicidade para células tumorais (S-180). Para o ensaio de citotoxicidade, o leite fermentado e o leite fermentado digerido usados foram inócuos em todas as concentrações utilizadas para linhagem celular J774.A1. Frente as células MDA-MB-231 e S180, os compostos peptídicos não apresentaram relevância significativa frente as células MDA-MB-231 e S-180. Esses resultados indicam que o leite de jumenta pasteurizado e fermentado antes e após o processo digestivo *in vitro*, podem ser fonte de peptídeos bioativos com propriedades antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensivo, inócuos e com prospectiva atividade frente a células tumorais, agregando valor ao produto, por ser um alimento que pode atuar como promotor da boa saúde podendo ser utilizado para indústria alimentícia e farmacêutica.

Palavras-chave: Alimento funcional, atividade biológica, citotoxicidade, digestão *in vitro*, fermentação, leite.

ABSTRACT

Milk and its derivatives contain a high amount of proteins, serving as a source of bioactive peptides that can influence in a beneficial way the health of the consumer after being released through fermentation and/or enzymatic processes. The objective of this work was to analyze peptides obtained from donkey milk (*Equus asinus*) pasteurized and fermented *Lactobacillus rhamnosus* using mass spectrometry and in vitro evaluation of its bioactive potential as antimicrobial, antioxidant, antihypertensive, and cytotoxic action. The milk obtained from donkey was pasteurized and fermented by *Lactobacillus rhamnosus*, resulting in pasteurized milk and fermented milk. After fermentation, the extracts were centrifuged and the supernatant submitted to the in vitro digestion process resulting in pasteurized milk digested and fermented milk digested. These samples were ultrafiltrated using fractions smaller than 3 kDa. The LC-MS/MS analysis of peptides was performed using an ultra efficient liquid chromatograph coupled to a Quadrupolo-ToF mass spectrometer. The antimicrobial activity was performed by the MIC method (minimum inhibitory concentration) against the Gram positive and negative pathogenic strains; antioxidant activity was performed by ABTS and DPPH; the antihypertensive activity was measured through the inhibition of the angiotensin-converting enzyme (ACE), and the cytotoxicity using the J774 cell lines. A1 (macrophages), MDA-MB-231 (human adenocarcinoma of the mammary gland) and S-180 (heterogeneous lineage of tumor) cells of mice of mesodermic origin. The chemical profile of the samples pasteurized milk and digested pasteurized milk is similar to the chemical profile of the samples of fermented milk and digested fermented milk, according to the analysis of the chromatograms of the base peak ions obtained both in positive and negative mode, allowed to identify the ten main peptides in the samples after in vitro digestion. The results of the antimicrobial activity of pasteurized milk and fermented milk showed inhibition against all the pathogenic strains, and in the digested pasteurized milk only the inhibition of Gram-positive strains occurred, and the fermented milk digested to the inhibition was dependent on the standardized concentration for *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. The antioxidant action by ABTS of peptidic extracts showed better activity after digestion, pasteurized milk digested with 1348.39 and the fermented milk digested 1373.77 mM of Trolox/100 mL, already for the test by DPPH showed better inhibition with fermented milk digested 75.86 mM of Trolox/100 mL. In the antihypertensive activity assays, the best results were with digested pasteurized milk IC₅₀ 10.81 ± 1.4 mg/mL, which increased ACE inhibition by decreasing its peptide concentration, and with fermented milk IC₅₀ 8.23 ± 1.23 mg/mL. The peptides present in the pasteurized milk sample in all concentrations used and all macrophages cells (J774.A1) were harmless, with cell viability higher than 80%. Regarding the sample of pasteurized milk digested, from 100 µg/mL it was toxic to the cell line MDA-MB-231, and from 200 µg/mL it showed toxicity to tumor cells (S-180). For the cytotoxicity test, fermented milk and digested fermented milk were harmless in all concentrations used for cell line J774.A1. In contrast to MDA-MB-231 and S180 cells, peptidic compounds were of no significant relevance. These results indicate that the milk of pasteurized and fermented donkey before and after the digestive process in vitro can be a source of bioactive peptides with antimicrobial properties, antioxidant, antihypertensive, harmless, and with prospective activity in front of tumor cells, adding value to the product, for being a food that can act as a promoter of good health and can be used for food and pharmaceutical industry.

Keywords: Functional food, biological activity, cytotoxicity, in vitro digestion, fermentation, milk.

LISTA DE ABREVIATURAS

< 3kDa	Menor de 3 quilodaltons
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)
as1	Alfa- S1-caseína
as2	Alfa- S2- caseína
APCI	Ionização química por pressão atmosférica
BAL	Bactéria ácido láctica
BCA	Ácido bicinconínico
BHI	Brain Heart Infusion
CID	Dissociação Induzida por Colisão
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ESI	Eletropulverização
EROx	Espécies reativas ao oxigênio
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
HA	Hipertensão arterial
HHL	Hippuril-His-Leu
IC ₅₀	Concentração mínima para inibir 50%
k-caseína	kappa caseína
LF	Leite Fermentado
LFD	Leite Fermentado digerido
LP	Leite Pasteurizado
LPD	Leite Pasteurizado digerido
mM	Milimol
PBA	Peptídeo bioativo
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
UFC	Unidade formadora de colônia
UPLC- DAD- qTOF	Cromatografia Líquida de Ultra eficiência acoplada a Detector de arranjo de Diodos e Espectrômetro de massas tipo Sequencial Quadrupolo-Tempo de Voo
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1. Valores dos parâmetros físico-químicos relatados na literatura 15
para o leite de diferentes espécies

Tabela 2. Atividades biológicas dos PBA obtidos a partir de leite 19
fermentado e/ou digerido

Capítulo II

Tabela 1. Peptídeos identificados na amostra de leite de jumenta 46
pasteurizado digerido (LPD) por UPLC-DAD-QTOF em modo positivo

Tabela 2. Peptídeos identificados na amostra de leite de jumenta 47
pasteurizado digerido (LPD) por UPLC-DAD-QTOF em modo negativo

Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos peptídeos leite pasteurizado antes 48
e após digestão *in vitro*

Capítulo III

Tabela 1. Peptídeos identificados na amostra de leite de jumenta 81
fermentado digerido (LFD) por UPLC-DAD-QTOF em modo positivo

Tabela 2. Peptídeos identificados na amostra de leite de jumenta 82
fermentado digerido (LFD) por UPLC-DAD-QTOF em modo negativo

Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos peptídeos do leite fermentado 83
antes e após digestão *in vitro*.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1. Jumento Nordestino (<i>Equus asinus</i>)	13
Figura 2. Funcionalidade fisiológica dos peptídeos bioativos de derivados lácteos	18
Figura 3. Captura de radical livre por molécula antioxidante	22
Figura 4. Ação fisiológica do sistema renina angiotensina aldosterona	24

Capítulo II

Figura 1. Fluxograma experimental das análises com o leite de jumenta pasteurizado	44
Figura 2. Cromatogramas de função de baixa energia de colisão obtidos no modo MS ^E com ionização por eletrospray positivo (ESI ⁺) (A1 e A2) eletrospray negativo (ESI ⁻) (B1 e B2) usando UPLC-qTOF das amostras LP (A) e LPD (B)	45
Figura 3. Atividade antioxidante dos peptídeos do leite de jumenta pasteurizado antes e após digestão <i>in vitro</i> pelo método ABTS e DPPH	50
Figura 4. Viabilidade celular sob influência do leite de jumenta pasteurizado e digerido	53

Capítulo III

Figura 1. Fluxograma experimental das análises com o leite de jumenta fermentado	78
Figura 2. Cromatogramas de função de baixa energia de colisão obtidos no modo MS ^E com ionização por eletrospray positivo (ESI ⁺) (A1 e A2) eletrospray negativo (ESI ⁻) (B1 e B2) usando UPLC-qTOF das amostras LP (A) e LPD (B)	79
Figura 3. Atividade antioxidante de peptídeos do leite de jumenta fermentado antes e após digestão <i>in vitro</i> pelo método ABTS e DPPH	85
Figura 4. Viabilidade celular sob influência do leite de jumenta fermentado e digerido	89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Jumentos na América do Sul e no Brasil.....	13
2.2 Leite de jumenta.....	14
2.3 Leite fermentado	15
2.4 Bactérias ácido lácticas	16
2.5 Peptídeos Bioativos.....	17
2.6 Atividade biológica dos peptídeos	20
2.6.1 Peptídeos antimicrobianos	20
2.6.2 Peptídeos antioxidante.....	21
2.6.3 Peptídeos anti-hipertensivo	24
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO I PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO	36
CAPÍTULO II Avaliação das propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-hipertensivas e citotóxicas dos peptídeos do leite de jumenta antes e após a digestão <i>in vitro</i>	37
Material Suplementar I.....	60
CAPÍTULO III Análise de peptídeos bioativos do leite de jumenta fermentado por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> antes e depois da digestão <i>in vitro</i>	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
Material Suplementar II.....	97

1. INTRODUÇÃO

O leite caracteriza-se como um alimento completo devido a sua riqueza nutricional, dentre os diferentes tipos de fontes lácteas, o leite de jumenta, representa uma das opções para a fabricação de derivados lácteos funcionais (YANGILAR, 2013). Este leite possui propriedades nutricionais e terapêuticas que auxiliam no tratamento de doenças gastrointestinais e infecciosas, além de apresentar características semelhantes ao leite humano (ASPRI, ECONOMOU E PAPADEMAS, 2017). Sobre o leite de jumenta também foi relatada atividades antimicrobiana, antioxidante, antiviral, anti-inflamatória e imunomodulatórias, sendo estas, atribuídas a sua composição proteica (BRUMINI et al., 2016; TIDONA, et al., 2011).

As proteínas lácteas apresentam número crescente de compostos que podem apresentar propriedades biofuncionais atribuídas principalmente aos peptídeos bioativos (EL-SALAM e EL-SHIBINY, 2013). Os peptídeos bioativos são compostos criptografados nas sequências primárias de proteínas na forma inativa que podem vir a exercer sua atividade no organismo quando liberados (NONGONIERMA e FITZGERALD, 2015), a liberação pode ocorrer por diferentes abordagens, incluindo: fermentação microbiana através de bactérias ácido lácticas (BAL), hidrólise enzimática e/ou digestão gastrointestinal *in vitro*, processos físico ou químicos (centrifugação, ultrafiltração e tratamentos ácido e/ou alcalinos) (NONGONIERMA, et al., 2016).

O alimento deixou de ser apenas uma fonte nutricional e passou a ter função específica, assim a procura por alimentos funcionais que contenham em sua composição potenciais promotores a saúde está em ascensão (CAMPBELL et al., 2017). Sendo assim, esse trabalho buscou aliar a biotecnologia a uma demanda crescente do consumidor em busca do equilíbrio entre a prevenção de doenças e a promoção à saúde e bem-estar através de hábitos alimentícios mais saudáveis.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Jumentos na América do Sul e no Brasil

Os jumentos (Fig. 1) são animais que foram domesticados na região nordeste da África por volta de 7.000 anos atrás e exerceram um papel de suma importância em auxílio à expansão da população humana, bem como nas atividades comerciais (CAMILLO et al., 2018). Eles pertencem ao Reino Animalia, Filo Chordata, Classe Mammalia, Ordem Perissodactyla, Família Equidae, Gênero *Equus* e Espécie *Equus asinus* (GRINDER et al., 2006; ARANGUREN et al., 2002; DOMINGUES, 1968).

Os espanhóis introduziram a espécie, na metade do século XV, através de suas principais rotas de exploração territorial e comercial na América do Sul, ocorrendo a disseminação deles na Colômbia, Venezuela, Equador, Peru (CARNEIRO et al., 2018), Nordeste e Sul do Brasil (PRIMO, 2004).

Figura 1. Jumento Nordestino (*Equus asinus*)



Fonte: <https://diariodotocantins.com.br>

Desde sua inserção, as tropas de jumentos no continente continuaram a se disseminar, especialmente após aplicação e adaptação ao trabalho em regiões de agricultura (CARNEIRO et al., 2018), condições fortemente relacionadas ao desenvolvimento social, cultural, e principalmente econômico, contudo, apresentou grande declínio ao final do século XX, estendendo-se aos últimos anos na América do Sul (FAO, 2019).

Mesmo mediante a desvalorização no campo, baseado no contexto histórico como trabalho, de forma atual a espécie é empregada em terapia/ animal de estimação (BURDEN e THIEMANN, 2015), e/ou produção de derivados lácteos.

De forma recente o interesse da comunidade científica envolvida pela recuperação da biodiversidade aumentou, e vem contribuindo com o resgate de algumas raças de jumentos que se tornaram quase extintas e na redescoberta do leite destes animais (MARTINI et al., 2018).

Em particular, o leite de jumenta é um produto valioso, no entanto, pouco explorado, que pode ser utilizado em múltiplas aplicações, tal como na estética em cosméticos e sabonetes, bem como para fabricação de derivados alimentícios (PIOVESANA et al., 2015).

2.2 Leite de jumenta

O leite de jumenta recebe atenção principalmente devido à sua composição físico-química e nutricional similar com o leite humano (Tab. 1) (ALTOMONTE et al., 2019; ASPRI et al., 2016; FRATINI et al., 2016; MURGIA et al., 2016) e por esta razão, em algumas situações, é recomendado como um substituto valioso para nutrição infantil (ASPRI, ECONOMOU e PAPADEMAS, 2017; BIDASOLO et al., 2012; BERTINO et al., 2010).

Em particular, o leite de jumenta também se caracteriza como melhor candidato em substituição aos demais lácteos, mediante a tolerabilidade clínica, palatabilidade, melhor digestibilidade (TIDONA et al., 2011), adequação nutricional a alérgicos à proteínas lácteas bovina (MEDHAMMAR et al., 2012; MONTI et al., 2007), fornecendo também funções fisiológicas adicionais, como substâncias antibacterianas e função reguladora (SALIMEI e FANTUZ, 2012).

Tabela 1. Valores dos parâmetros físico-químicos relatados na literatura para o leite de diferentes espécies

g/L	Não Ruminantes			Ruminantes		
	Humano	Égua	Jumenta	Vaca	Ovelha	Cabra
Matéria seca	108-152	93-116	85-118	118-130	181-200	119-163
Proteínas	7-35	14-32	15-22	30-39	45-70	30-52
Caseína	2,4-4,2	9,4-13,6	6,4-10,3	24,6-28	41,8-46	23,3-46,3
Gordura	34-48	3-42	1-38	33-54	50-90	30-72
Lactose	67-78	56-72	61-73	44-56	41-59	32-50
Cinzas	1,7-2,1	3-5	3-4	7-8	8-10	7-9
Energia (kJ/l)	2843	1936-2050	1607-1803	2709-2843	4038-4439	2802-2894

Fonte: Altomonte et al. (2019); Claeys et al. (2014).

Os componentes físico-químicos dos leites em geral (Tab. 1) são os mesmos, entretanto existe uma variação em decorrência de fatores genéticos, fisiológicos, nutricionais e ambientais (CLAEYES et al., 2014). Além disso, pode existir uma variação em termos de composição de aminoácidos essenciais que acontece ao longo da lactação, esse fato não é observado no leite de jumenta (GUO et al., 2007). Essa estabilidade, em termos de aminoácidos, pode garantir a produção de derivados lácteos fermentados mais homogêneos (ASPRI et al., 2018).

2.3 Leite fermentado

A busca por produtos alimentícios com propriedades funcionais que podem contribuir com a saúde do consumidor tem aumentado, e com ela a produção de fermentados lácteos funcionais (SALMERÓN, THOMAS e PANDIELLA, 2015; MOCANU et al., 2011; GABRIEL-DANUT et al., 2009).

A fermentação caracteriza-se como um dos métodos mais antigos de conservação da vida útil dos alimentos, tornando-os mais práticos, além de poder associar a melhoria da saúde e bem-estar (CORBO et al., 2014; GRANATO et al., 2010).

Leite fermentado caracteriza-se por ser produto adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos, que devem estar viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (BRASIL, 2007).

O leite fermentado por bactérias ácido lácticas é consumido em todo o mundo, sendo os mais populares: iogurte, leite cultivado, coalhada, kefir dentre outros, podendo exercer benefícios a saúde, relacionados com a melhoria das condições intestinais, incluindo doença inflamatória intestinal, prevenção de patógenos infecciosos e intolerância a lactose (SANCHEZ et al., 2017; CEAPA et al., 2013), ativação do sistema imunológico, prevenção do câncer, bem como efeitos hipolipidêmicos e hipotensores (CHANG et al., 2012; OOI e LIONG, 2010).

2.4 Bactérias ácido lácticas

As bactérias ácido lácticas (BAL) podem ser classificadas como homofermentativas, que fermentam açúcares para produzir principalmente ácido láctico em condições anaeróbicas: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* e *Tetragenococcus* (DE SOUZA OLIVEIRA et al., 2012b) e as heterofermentativas onde os açúcares são fermentados para produzir prioritariamente etanol, CO₂, e em menor proporção ácido láctico: *Leuconostoc* *Lactobacillus* (DE SOUZA OLIVEIRA et al., 2012a).

O sistema enzimático das BAL, como por exemplo, dos lactobacilos é essencial, pois, além de realizar a fermentação láctica contribui de forma significativa no desenvolvimento de sabor e textura (PEPE et al., 2013; TURBAY et al., 2012; SAVIJOKI, INGMER e VARMANEN, 2006).

Durante a fermentação por BAL, são produzidos diferentes tipos e concentrações de ácidos orgânicos, que contribuem para a avaliação sensorial (HELLAND, WICKLUND e NARVHUS, 2004), entretanto, estes microrganismos são exigentes e requerem vários tipos de nutrientes e condições específicas como controle de CO₂/O₂ e temperatura para o seu crescimento e multiplicação (NAZARI, 2011).

O leite por ser uma fonte rica em nutrientes, é frequentemente submetido ao processo fermentativo para o desenvolvimento de BAL, que resulta em diferentes derivados lácteos, incluindo queijos, iogurte, leite azedo e leitelho (BOUTEILLE et al., 2013).

Portanto, o valor funcional do leite de jumenta pode ser ainda mais explorado através da fermentação por microrganismos selecionados que possuam propriedades específicas (ASPRI et al., 2018). Neste sentido, são destacadas as BAL probióticas, que são considerados microrganismos vivos que podem fornecer efeitos benéficos à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas e consumidos regularmente (LEE et al., 2015; REDDY, MIN e WEE, 2015; HILL et al., 2014).

Estudos realizados utilizaram estirpes probióticas para fermentação do leite de jumenta, como exemplo *Lactobacillus rhamnosus* AT 194 e CLT 2/2, e *Lactobacillus casei* LC 88 (CHIAVARI et al., 2005), *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* (PERNA et al., 2015), *Lactobacillus plantarum* e *Streptococcus thermophilus* (TURCHI et al., 2017). Assim, a fermentação láctea por BAL probióticas corresponde a um método econômico, prático e eficaz para a produção de derivados que apresentam peptídeos com elevadas características funcionais (HAYES et al., 2007; FITZGERALD e MURRAY, 2006).

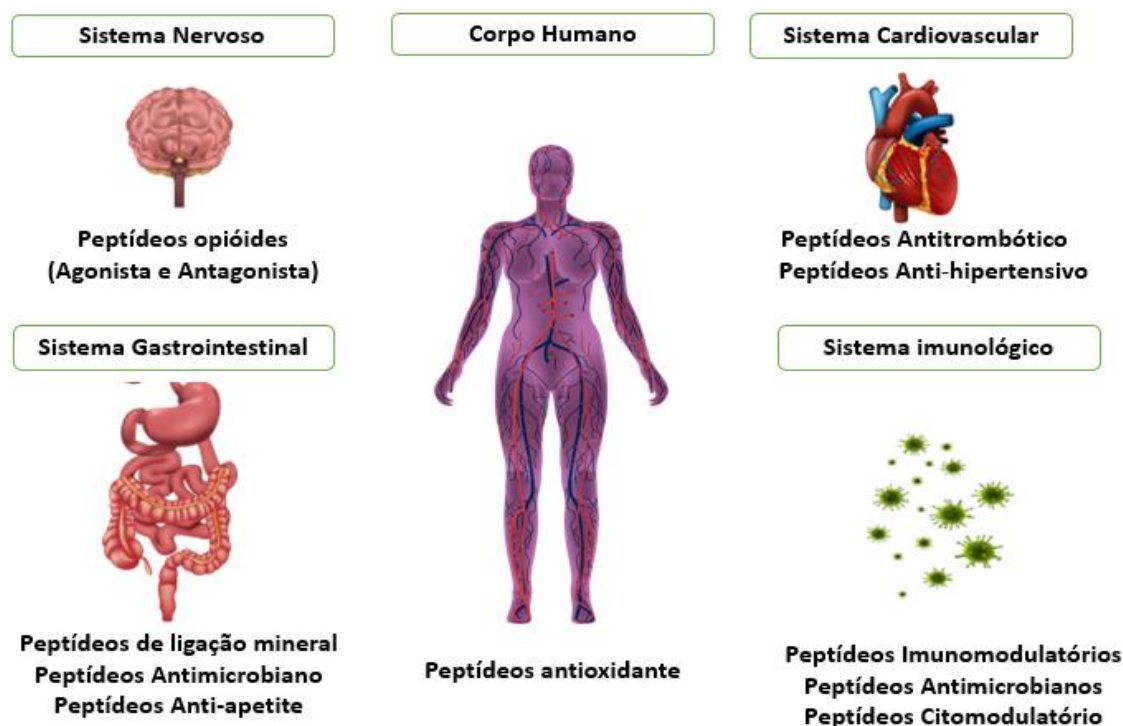
2.5 Peptídeos Bioativos

Além do valor nutricional, muitas propriedades funcionais são atribuídas ao leite de jumenta, tais como ação antimicrobiana, anti-inflamatória e imunomodulador, bem como hipoalergênica (ASPRI et al., 2018). Essas propriedades estão relacionadas à presença de constituintes do leite em altas quantidades, como por exemplo imunoglobulinas, lisozima, lactoferrina, ácidos graxos, moderadas proporções de caseína e peptídeos bioativos (PBA) (BRUMINI et al., 2016; TIDONA et al., 2011).

No que diz respeito aos PBA (Fig. 2), estes são definidos como sequências entre 2 a 30 aminoácidos criptografados em determinadas proteínas, que podem exercer propriedades fisiológicas potenciais ao

organismo, além do valor nutricional básico (GIANFRANCESCHI et al., 2018; GIACOMETTI E BURETIC-TOMLJANOVIC, 2017; HAYES et al., 2007A).

Figura 2. Funcionalidade fisiológica dos peptídeos bioativos de derivados lácteos



Fonte: Giacometti e Buretic-Tomljanovic (2017) adaptado.

Os peptídeos bioativos podem ser liberados no organismo durante o processamento de alimentos, como a fermentação por diferentes BAL com propriedades proteolíticas específicas e/ou por digestão gastrointestinal pela ação de enzimas não específicas (pepsina, tripsina ou quimotripsina) (DALIRI, LEE E OH, 2018) ou por microrganismos pertencentes à microbiota intestinal (GIACOMETTI e BURETIC-TOMLJANOVIC, 2017; KORHONEN e PHILANTO, 2006). Outras formas de produção de peptídeos bioativos são por meio do uso de temperatura elevada, condições alcalinas ou ácidas (DALIRI, OH e LEE, 2017).

Esses peptídeos quando disponíveis no trato gastrointestinal podem ser absorvidos através da membrana de borda em escova por transmissão física ou através dos agentes transportadores específicos de proteínas (SAADI et al., 2015), exibindo funções biológicas que afetam a ingestão de alimentos, fatores de crescimento e reguladores fisiológicos e imunológicos (KORHONEN, 2009).

Além disso, a eficácia bioativa desses peptídeos é dependente da composição e sequência de aminoácidos, podendo apresentar-se nas formas de di-, tri-, tetra- ou polipeptídeos, de acordo com o número de ligações do grupamento amina (CHAVES-LÓPES et al., 2014; LÓPEZ-EXPOSITO, AMIGO E RECIO, 2012; KORHONEN, 2009).

O processo de liberação, fermentação e/ou digestão, podem constituir a etapa final de hidrólise na geração de PBA (PEPE et al., 2016 CAPRIOTTI et al., 2015), que exercem uma gama de atividades biológicas (Tab. 2), como propriedades opióides, antitrombóticas, antimicrobianas, anti-hipertensivas, antioxidantes, imunomodulatórias, dentre outras (SULTAN et al., 2018 NIELSEN et al., 2017; PETRAT-MELIN et al., 2016; NONGONIERMA e FITZGERALD, 2015).

Tabela 2. Atividades biológicas dos PBA obtidos a partir de leite fermentado e/ou digerido

Fonte proteica	Método	Atividade biológica	Referência
Leite de Camela	Fermentação (<i>L. plantarum</i>)	Antimicrobiana	Muhialdin e Alghoory (2018)
Leite de Vaca	Fermentação (<i>L. plantarum</i>)	Antimicrobiana	Aguilar-Toalá et al. (2017)
Leite de Vaca	Fermentação (<i>L. delbrueckii</i>)	Anti-hipertensivo	Wu et al. (2019)
Leite de Vaca	Fermentação (<i>L. Casei</i>)	Antioxidante Anti-hipertensiva Quelante de ferro Anticâncer	Abdel-Hamid et al. (2019)
Leite de Jumenta	Fermentação (<i>E. faecium</i>) e digestão	Antioxidante Antimicrobiana Anti-hipertensiva	Aspri et al. (2018)
Leite de Cabra	Digestão	Antimicrobiano	Esmaeilpour et al. (2016)
Leite de Cabra	Digestão	Antioxidante	Espejo-carpio et al. (2016)
Leite de Camela	Digestão	Anti-hipertensivo	Tagliazucchi et al. (2016)
Leite de Cabra	Digestão	Anti-hipertensivo	Tagliazucchi et al. (2017)

Fonte: A autora

2.6 Atividade biológica dos peptídeos

2.6.1 Peptídeos antimicrobianos

O aumento de bactérias resistentes é um problema alarmante de saúde global, pois há um número crescente de agentes patogênicos que desenvolveram resistência aos compostos antimicrobianos (OMS, 2019).

O rápido aumento de contaminação por bactérias resistentes a antibióticos enfatiza a necessidade de buscar novas alternativas para contornar a proliferação destas bactérias (LÓPEZ-MEZA et al., 2015). Neste sentido, a utilização de fontes naturais de compostos antimicrobianos como os peptídeos bioativos proporciona grande potencial (LIU et al., 2016).

Os peptídeos antimicrobianos contêm sequências de aminoácidos específicas, que apresentam atividade biológica em defesa do organismo frente a microrganismos patogênicos (CORRÊA et al., 2019). Podem ser obtidos por diferentes fontes: plantas, fungos e bactérias, sendo classificados em diferentes grupos de acordo com seu tamanho e composição estrutural (REN et al., 2019; MIKUT et al., 2016; BROGDEN et al., 2005).

As diferentes características moleculares, incluindo composição de aminoácidos, anfipaticidade, cargas elétricas e tamanho, devido a isso, facilitam a rápida difusão e secreção de peptídeos fora das células, induzindo a sua interação em bicamadas lipídicas e consequente promovem a resposta de defesa imediata contra microrganismos patogênicos, neste caso, acarretando extravasamento celular (CIUMAC et al., 2019).

Em geral as moléculas antimicrobianas acoplam-se a membrana e/ou citoplasma dos microrganismos, e alteram suas funções, o que pode resultar na morte celular ou à inativação metabólica (NORDSTROM et al., 2018), que culminará na inibição da biossíntese da parede celular, ácidos nucleicos, proteínas e funções enzimáticas (ZHOU et al., 2019; MALEKKHAIAT e MALMSTEN, 2018).

No que diz respeito a compostos antimicrobianos em alimentos, alguns peptídeos, com a presença da nisina (produzida por cepas de *Lactococcus lactis*) é amplamente utilizado como conservante de alimentos contra microrganismos patogênicos e deteriorantes (KUMAR et al., 2016a). Já foram relatados que leite

e derivados são eficazes contra várias bactérias gram-positivas e gram-negativas (MOHANTY et al., 2016), tais como *Escherichia coli* (MIAO et al., 2016), *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (NAGHMOUCHI et al., 2007).

O leite caracteriza-se como meio para obtenção de peptídeos antimicrobianos pois fornece fatores e compostos de defesa no sistema peróxido lactoperoxidase (AL-BAARRI et al., 2012), como imunoglobulinas (MIN, HARRIS e KROCHTA, 2005), e em particular, proteínas com ação antimicrobiana, como lisozima e lactoferrina (ZHANG et al., 2008).

Além disso, muitos peptídeos antimicrobianos podem ser produzidos através da digestão enzimática de alimentos, sendo chamados de "peptídeos crípticos", pois são encontrados dentro de proteínas parentais maiores (PANE et al., 2017; PELLEGRINI et al., 2003).

Compostos enzimáticos e peptídicos no leite de jumenta possuem características únicas, como por exemplo: propriedade bactericida atribuídas a presença da lisozima e lactoferrina, que o diferencia dos leites de outros mamíferos (MALACARNE et al., 2002). O nível de lactoferrina é duas vezes maior que o do leite bovino (MALACARNE et al., 2002). Em particular, a concentração de lisozima no leite de jumenta atinge o nível de 4000 mg/L, enquanto apenas traços foram encontrados no leite bovino (GUO et al., 2007).

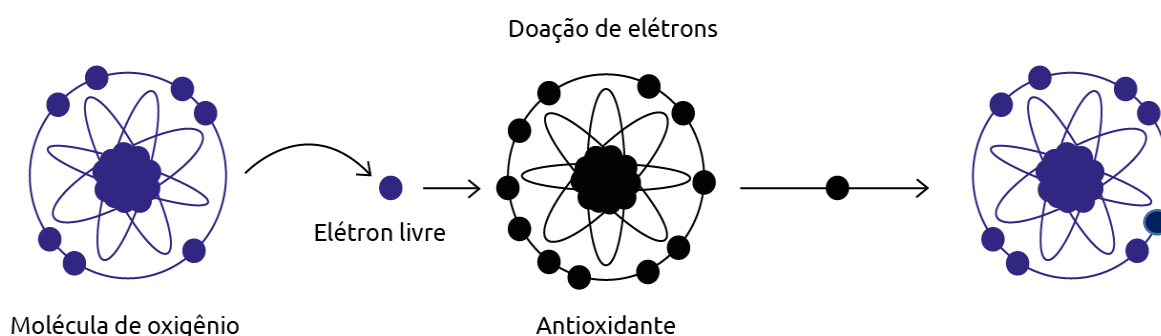
Esse fato reflete no potencial bioativo dos compostos presentes desses alimentos, pois, além dos aspectos nutricionais, sua ingestão pode trazer diferentes benefícios, seja pela ação antimicrobiana contra patógenos, seja por outras atividades, como a antioxidante já verificada (AMORIN et al., 2019; MORTIMER et al., 2016).

2.6.2 Peptídeos antioxidante

O processo oxidativo é derivado da superprodução de espécies reativas ao oxigênio (EROx) no organismo, ocorre por reações endógenas (ex: cadeia respiratória) e/ou exógenas devido a exposição a agentes físicos e químicos (ex: radiação UV) que liberam moléculas de oxigênio, o radical livre (Fig. 3) (LORENZO et al., 2018).

As EROx, quando formadas, podem afetar a homeostase celular causando instabilidade em componentes essenciais ao metabolismo, tais como: lipídios, DNA e proteínas, associadas aos processos fisiológicos podendo induzir o desenvolvimento de doenças como aterosclerose, hipertensão e câncer. Para manter o equilíbrio, o radical “captura” elétrons de outras moléculas, neste sentido, os compostos antioxidantes podem “doar” um elétron ao radical, neutralizando sua ação prejudicial (LOBO et al., 2010).

Figura 3. Captura de radical livre por molécula antioxidante



Fonte: A autora¹

¹Estabilização de molécula oxidativa por transferência de elétrons para orbital externo adjacente

As células eucarióticas apresentam um sistema de prevenção ao dano oxidativo utilizando antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que promovem o equilíbrio, reduzindo a concentração e a ação de EROx (LORENZO et al., 2018). Entretanto, esse equilíbrio pode ser desestabilizado pela constante geração de EROx, sendo necessária proteção adicional para a manutenção do equilíbrio do estado oxidativo (BOUAYED e BOHN, 2010).

Quando há um desequilíbrio do sistema antioxidante natural é necessária a utilização de compostos antioxidantes sintéticos para retardar tal processo, no entanto, esses produtos podem representar perigo a saúde, como danos ao DNA e toxicidade (CHI et al., 2015; WANG et al., 2014). Assim, a procura por compostos antioxidantes de fontes naturais como proteínas e peptídeos de origem vegetal e animal são necessárias (ZHANG, LI e ZHOU, 2010; XUE et al., 2009).

Peptídeos bioativos podem exercer atividade antioxidante dependente da sequências de aminoácidos, uma vez que proteínas precursoras

intactas podem não apresentar o mesmo efeito antioxidante (GALLEGO et al., 2017; HOMAYOUNI- TABRIZI, ASOODEH e SOLTANI, 2017; RIZZELLO et al., 2017; JEMIL et al., 2016).

O uso de microrganismos proteolíticos também corresponde a uma estratégia para liberação de peptídeos antioxidantes, por exemplo, durante o processamento de derivados lácteos.

Farvin et al. (2010) encontraram peptídeos antioxidantes da β -caseína e fragmentos peptídicos da porção n-terminal contendo α 1 (Alfa- S1-caseína), α 2 (Alfa- S2- caseína) e κ -caseína (kappa caseína) de iogurte. Os peptídeos gerados pela caseína ovina hidrolisada por proteases microbianas derivadas de *Bacillus* sp. P7 também demonstraram atividade antioxidante (CORRÊA et al., 2011).

Estudos vêm demonstrando elevada atividade antioxidante em lácteos e derivados em diferentes espécies de mamíferos. Soleymanzadeh et al. (2019) purificou e identificou a sequência peptídica (MVPYPQR) com ação antioxidante derivado da β -caseína do leite de camela fermentado por *Leuconostoc lactis* PTCC1899. Aguilar-Toalá et al. (2017) utilizando peptídeos < 3 kDa obtido do leite bovino fermentado por *Lactobacillus plantarum* constataram melhor eliminação de radical com a menor fração peptídica.

Mohanty et al. (2016b) revisaram como a digestão e a atividade enzimática afetaram a liberação de peptídeos bioativos de diferentes proteínas lácteas. Diversos estudos relatam que após o processo digestivo a ação antioxidante é potencializada, mediante a clivagem das proteínas parentais e uma maior liberação de peptídeos. Hodgkinson et al. (2019) identificaram a sequência de peptídeos antioxidante (FALPQYLK / YQKFPQY) oriundos da α 2 do leite bovino e caprino respectivamente após condições simuladas de digestão *in vitro*.

Aspri et al. (2018) analisaram leite de jumenta fermentado por *Enterococcus faecium* DM33, exibindo melhor atividade antioxidante após o processo digestivo. Belisicata et al. (2018) identificaram peptídeos antioxidantes originados da κ -CN, α 1-CN e β -CN do iogurte produzido com leite de búfala após digestão *in vitro*.

Neste sentido, Chakrabarti, Jahandideh e Wu (2014) afirmaram que os peptídeos antioxidantes podem fortalecer as defesas biológicas contra doenças

inflamatórias do estresse oxidativo. De forma semelhante, Cicero, Fogacci e Colletti (2017) destacaram as bioatividades que os peptídeos podem exercer, particularmente para doenças hipertensivas.

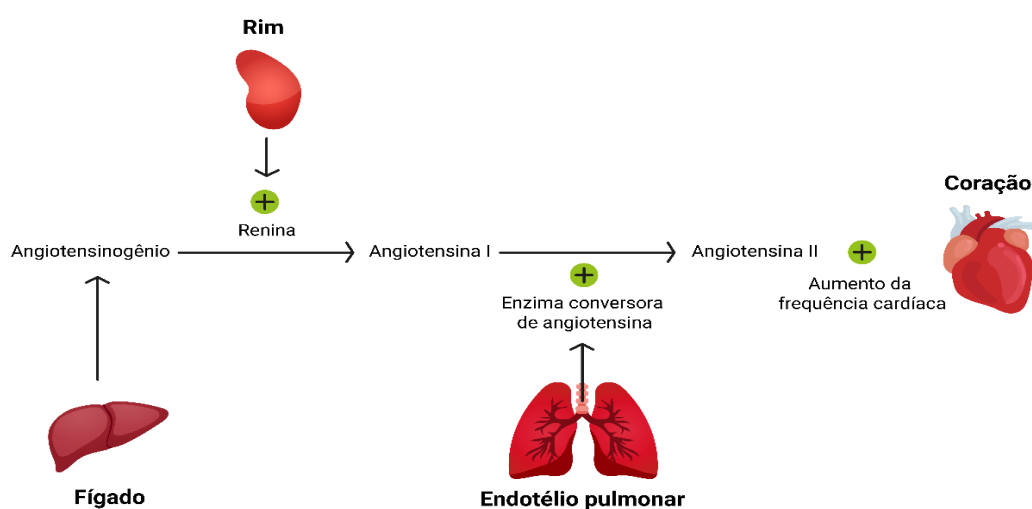
2.6.3 Peptídeos anti-hipertensivo

A hipertensão arterial (HA) é um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares, que induz a acidente vascular cerebral, doença cardíaca coronária, aterosclerose e insuficiência cardíaca (DASKAYA-DIKMEN et al., 2017).

A HA é um parâmetro que apresenta regulação multifatorial, onde a enzima conversora de angiotensina (ECA) corresponde a um dos principais reguladores do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (AMORIM et al., 2019b), conhecida como uma enzima chave envolvida na regulação da pressão arterial, sendo a mais extensivamente estudada (VÁSQUEZ- VILLANUEVA et al., 2018).

No SRAA, a ECA é uma enzima dipetidilcarboxipeptidase que auxilia na regulação da pressão sanguínea, a ECA catalisa a hidrólise do decapeptídeo inativo (angiotensina I), por clivagem do seu peptídeo C-terminal, no octapeptídeo ativo (angiotensina II), um potente vasoconstritor endógeno (BHASKAR et al., 2019), que também induz a liberação de aldosterona e, portanto, aumenta a concentração plasmática de sódio e a pressão arterial (AMORIM et al., 2019a)(Fig. 4).

Figura 4. Ação fisiológica do sistema renina angiotensina aldosterona



Fonte: A autora¹

¹Fluxograma do sistema renina angiotensina aldosterona e percussores nos órgãos

Os inibidores sintéticos da ECA mais conhecidos são Benazepril, Captopril, Enalapril, Perindopril, Trandolapril, Quinapril (LEE E HUR et al., 2017), comumente são utilizados para o tratamento da hipertensão (IBRAHIM, AHMED e MIYATA, 2017), contudo, tais inibidores sintéticos apresentam efeitos colaterais, incluindo elevação dos níveis de potássio, dores de cabeça, fadiga erupções cutâneas, tosse seca e distúrbios do paladar após uso prolongado, insuficiência renal e edema angioneurótico (DASKAYA-DIKMEN et al., 2017; CHEN et al., 2013; LI et al., 2006; COOPER et al., 2006).

Devido os efeitos colaterais de fármacos hipotensores, pesquisas tem se voltado para a busca de novas fontes naturais contendo peptídeos inibitórios da ECA no SRAA (UDENIGWE E ALUKO, 2012; HERNANDEZ-LEDESMA et al., 2011). Neste sentido PBA com propriedades anti-hipertensivas obtidos de compostos lácteos por hidrólise enzimática ou por meio da fermentação (AMORIN et al., 2019b; MUDGIL et al., 2019) já encontrados em coalhada, queijos, caseínas e hidrolisado de soro de leite (RANI et al., 2017; MAMILLA e MISHRA, 2017; AMIGHI et al., 2016).

A fermentação láctea, utilizando diferentes espécies de *Lactobacillus*, tais como, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. lactis* ou *L. reuteri* tem se apresentado como um processo importante na obtenção de peptídeos bioativos com diferenças na capacidade de inibição da ECA. Tendo em vista que cada microrganismo possui diferentes sistemas proteolíticos e assim, produzem moléculas com diferentes atividades inibitórias da ECA (AHN et al., 2009).

Moreno-Montoro et al., (2017) obtiveram resultados frente a ECA utilizando peptídeos ultrafiltrados < 3 kDa obtidos do leite de cabra fermentado por *Lactobacillus plantarum* C4. Wu et al. (2019) isolaram e identificaram o peptídeo LPYPY derivado da κ -caseína com atividade hipotensiva a partir do leite bovino fermentado obtido com *Lactobacillus delbrueckii* QS306.

Tagliazucchi et al. (2017) identificaram peptídeos inibidores da ECA originados da β -caseína, liberados após a digestão gastrointestinal *in vitro* do leite de cabra desnatado. Jin et al. (2016), observaram melhor elevação na inibição frente a ECA após o processo digestivo utilizando peptídeos obtidos de iogurte comercial produzido com leite bovino contendo *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Análise de peptídeos obtidos do leite de jumenta (*Equus asinus*) pasteurizado e fermentado por *Lactobacillus rhamnosus* e avaliação *in vitro* de seu potencial bioativo

3.2 Objetivos específicos

- Produzir o leite fermentado através da liberação do ácido lácteo utilizando como matéria prima o leite de jumenta pasteurizado e *Lactobacillus rhamnosus*;
- Realizar o processo de digestão *in vitro* do leite de jumenta pasteurizado e fermentado;
- Extrair peptídeos do leite de jumenta a partir de amostras adquiridas do leite pasteurizado e fermentado, ambos antes e após o processo de digestão *in vitro*;
- Estudar o perfil dos peptídeos obtidos através de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrometria de massa sequencial quadrupolo tempo de voo (UPLC-DAD-qTOF) com ionização por eletrospray (ESI);
- Determinar a massa molecular e o sequenciamento dos fragmentos dos peptídeos encontrados na análise por espectrometria de massas;
- Analisar a atividade antimicrobiana e antioxidante das frações peptídicas;
- Avaliar a capacidade inibitória dos extratos peptídicos contra a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA);
- Investigar a capacidade de toxicidade dos peptídeos frente a linhagens celulares.

4. REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, M. et al. The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 91, p. 1-8, 2019.
- AGUILAR-TOALÁ, J. E. et al. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 65-75, 2017.
- AHN, J. E. et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey fermented by *Lactobacillus* species. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 587-602, 2009.
- AL-BAARRI, A. N. et al. Lactoperoxidase immobilized onto various beads for producing natural preservatives solution. **Journal Aplikasi Teknologi Pangan**, v. 1, n. 1, 2012.
- AMORIM, M. et al. Antihypertensive effect of spent brewer yeast peptide. **Process Biochemistry**, v. 76, n. 1, p. 213-218, 2019. A
- AMORIM, F. G. et al. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. **Food Chemistry**, v. 282, n. 1, p. 109-119, 2019. B
- AMIGHI, F. et al. Optimised production and spray drying of ACE-inhibitory enzyme-modified cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 83, n. 1, p. 125-134, 2016.
- ASPRI, M. et al. Bioactive properties of fermented donkey milk, before and after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 268, p. 476-484, 2018.
- ASPRI, M.; ECONOMOU, N.; PAPADEMAS, P. Donkey milk: An overview on functionality, technology, and future prospects. **Food Reviews International**, v. 33, n. 3, p. 316-333, 2017.
- ARANGUREN-MENDEZ J.; GÓMEZ M.; JORDANA J. Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. **Heredity**, v.89, n. 3, p. 207-211, 2002.
- BASILICATA, M. G. et al. Peptidome profiles and bioactivity elucidation of buffalo-milk dairy products after gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 105, n.1, p. 1003-1010, 2018.
- BERTINO, E. et al. Detailed proteomic analysis on DM: insight into its hypoallergenicity. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 2, p. 526-536, 2010.
- BHASKAR, B. et al. Purification, identification, and characterization of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from alcalase digested horse gram flour. **Food Science and Technology**. v. 103, n. 1, p. 155-161, 2019.
- BIDASOLO, I. B.; RAMOS, M.; GOMEZ-RUIZ, J. A. *In vitro* simulated gastrointestinal digestion of donkeys' milk. Peptide characterization by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **International Dairy Journal**, v. 24, n. 2, p. 146-152, 2012.
- BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.

BOUTEILLE, R. et al. Monitoring lactic acid production during milk fermentation by in situ quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 4, p. 2071-2080, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução. Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial da União, Brasília, 24 out. 2007, Seção 1.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

BRUMINI, D. et al. Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. **Dairy Science & Technology**, v. 96, n. 1, p. 1-14, 2016.

BURDEN, F.; THIEMANN, A. Donkeys are different. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 5, p. 376-382, 2015.

CAMILLO, F. et al. The current situation and trend of donkey industry in Europe. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, n.1, p. 44-49, 2018.

CAMPBELL, M. S. et al. Responsiveness to curcumin intervention is associated with reduced aortic stiffness in young, obese men with higher initial stiffness. **Journal of Functional Foods**, v. 29, n.1, p. 154-160, 2017.

CARNEIRO, G. F.; LUCENA, J. E. C.; DE OLIVEIRA BARROS, L. The current situation and trend of the donkey industry in South America. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, n.1, p. 106-110, 2018.

CAPRIOTTI, A. L. et al. Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 44, p. 205-213, 2015.

CEAPA, C. et al. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, n. 1, p. 139-155, 2013.

CHAKRABARTI, S.; JAHANDIDEH, F.; WU, J. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. **BioMed Research International**, v. 2014, n.1, p. 1-11, 2014.

CHANG, J-H. et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 361-368, 2012.

CHAVES-LÓPEZ, C. et al. Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. **Food Microbiology**, v. 42, p. 117-121, 2014.

CHEN, J. et al. Comparison of analytical methods to assay inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3329-3334, 2013.

CHI, C.F. et al. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 1-10, 2015.

CHIAVARI, C. et al. Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli. **Le Lait**, v. 85, n. 6, p. 481-490, 2005.

CICERO, A. F. G.; FOGACCI, F.; COLLETTI, A. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1378-1394, 2017.

- CIUMAC, D. et al. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 537, n.1, p. 163-185, 2019.
- CLAEYS, W. L. et al. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. **Food Control**, v. 42, n.1, p. 188-201, 2014.
- COOPER, W. O. et al. Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 23, p. 2443-2451, 2006.
- CORBO, M. R. et al. Functional beverages: the emerging side of functional foods: commercial trends, research, and health implications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 6, p. 1192-1206, 2014.
- CORRÊA, J. A. F. et al. Fundamentals on the Molecular Mechanism of Action of Antimicrobial Peptides. **Materialia**, p. 100494, 2019.
- CORRÊA, A. P. F. et al. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 12, p. 2247-2254, 2011.
- DALIRI, E. B-M.; LEE, Byong H.; OH, Deog H. Current trends and perspectives of bioactive peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 13, p. 2273-2284, 2018.
- DALIRI, E.B, OH, D.H, LEE, B.H. Bioactive Peptides. **Foods**. v. 6, n°32, p. 1-21, 2017.
- DASKAYA-DIKMEN, C. et al. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 316, 2017.
- DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185-198, 2015.
- DE SOUZA OLIVEIRA, Ricardo Pinheiro et al. Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 358-363, 2012.A
- DE SOUZA OLIVEIRA, Ricardo Pinheiro et al. Co-metabolic models of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus bulgaricus* or *Lactobacillus acidophilus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 62, p. 62-69, 2012.B
- DOMINGUES, O. Introdução a Zootecnia. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola - Ministério da Agricultura. 1968. 386 p. (Série didática - n. 5).
- EL-SALAM, M.H A.; EL-SHIBINY, S. Bioactive peptides of buffalo, camel, goat, sheep, mare, and yak milks and milk products. **Food Reviews International**, v. 29, n. 1, p. 1-23, 2013.
- ESMAEILPOUR, M. et al. Antimicrobial activity of peptides derived from enzymatic hydrolysis of goat milk caseins. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 3, p. 599-605, 2016.
- ESPEJO-CARPIO, F. J. et al. Effect of digestive enzymes on the bioactive properties of goat milk protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 54, p. 21-28, 2016.
- FARVIN, K.H.S et al. Antioxidant activity of yoghurt peptides: part 2—characterization of peptide fractions. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1090-1097, 2010.

FITZGERALD, R. J.; MURRAY, B. A. Bioactive peptides and lactic fermentations. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 2, p. 118-125, 2006.

FRATINI, F. et al. Does the addition of donkey milk inhibit the replication of pathogen microorganisms in goat milk at refrigerated condition?. **Dairy science & technology**, v. 96, n. 2, p. 243-250, 2016.

GABRIEL-DANUT, M. et al. Research concerning the production of a probiotic dairy product with added medicinal plant extracts. The Annals of the University of Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI. **Food Technology**, v. 32, n.1, p. 37, 2009.

GALLEGO, M. et al. Effect of cooking and in vitro digestion on the antioxidant activity of dry-cured ham by-products. **Food Research International**, v. 97, n.1, p. 296-306, 2017.

GIACOMETTI, J.; BURETIĆ-TOMLJANOVIĆ, A. Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. **Food Chemistry**, v. 230, n.1, p. 91-98, 2017.

GIANFRANCESCHI, G. L. et al. Biochemical requirements of bioactive peptides for nutraceutical efficacy. **Journal of Functional Foods**, v. 47, n.1, p. 252-263, 2018.

GRANATO, D. et al. Probiotic dairy products as functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 5, p. 455-470, 2010.

GRINDER, M.I.; KRAUSMAN P.R.; HOFFMAN, R.S. *Equus asinus*. Mammalian species.794: p.1-9, 2006.

GUO, H. Y. et al. Composition, physiochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1635-1643, 2007.

HÄFFNER, S. M.; MALMSTEN, M. Influence of self-assembly on the performance of antimicrobial peptides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 38, n.1, p. 56-79, 2018.

HAYES, M. et al. Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: overview. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 2, n. 4, p. 426-434, 2007.

HAYES, M. et al. Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 2, n. 4, p. 435-449, 2007.B

HELLAND, M. H.; WICKLUND, T.; NARVHUS, J. A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 305-313, 2004.

HERNANDEZ-LEDESMA, B. et al. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid Interface Science**, v. 165, n. 1, p. 23-35, 2011.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506, 2014.

HODGKINSON, Alison J. et al. Gastric digestion of cow and goat milk: Peptides derived from simulated conditions of infant digestion. **Food Chemistry**, v. 276, n.1, p. 619-625, 2019.

HOMAYOUNI-TABRIZI, M.; ASOODEH, A.; SOLTANI, M. Cytotoxic and antioxidant capacity of camel milk peptides: Effects of isolated peptide on superoxide dismutase and catalase gene expression. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 3, p. 567-575, 2017.

IBRAHIM, H. R.; AHMED, A. S.; MIYATA, T. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 1, p. 63-71, 2017.

JEMIL, I. et al. A peptidomic approach for the identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in sardinelle protein hydrolysates fermented by *Bacillus subtilis* A26 and *Bacillus amyloliquefaciens* An6. **Food Research International**, v. 89, n.1, p. 347-358, 2016.

JIN, Y. et al. Peptide profiling and the bioactivity character of yogurt in the simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Proteomics**, v. 141, n.1, p. 24-46, 2016.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 177-187, 2009.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 945-960, 2006.

KUMAR, D. Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. **Small Ruminant Research**, v. 139, p. 20-25, 2016a.

LEE, S. Y., HUR, S. J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. **Food Chemistry**, v. 228, n. 1, p. 506-517, 2017.

LEE, Myung-Hee et al. Quality and antioxidant activity of ginseng seed processed by fermentation strains. **Journal of Ginseng Research**, v. 39, n. 2, p. 178-182, 2015.

LI, G. H. et al. Antihypertensive effect of alcalase generated mung bean protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. **European Food Research and Technology**, v. 222, n.1, p. 733-736, 2006.

LIU, M. et al. Bioactive peptides derived from traditional Chinese medicine and traditional Chinese food: A review. **Food Research International**, v. 89, n. 1, p. 63-73, 2016.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

LOPEZ-MEZA, J. E. et al. Antimicrobial peptides: Current and potential applications in biomedical therapies. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-2, 2015.

LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; AMIGO, L.; RECIO, I. A mini-review on health and nutritional aspects of cheese with a focus on bioactive peptides. **Dairy Science & Technology**, v. 92, n. 5, p. 419-438, 2012.

LORENZO, J. M. et al. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, n.1, p. 136-147, 2018.

MALACARNE, M. et al. Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 11, p. 869-877, 2002.

MAMILLA, R. K.; MISHRA, V. K. Effect of germination on antioxidant and ACE inhibitory activities of legumes. **Food Science and Technology**, v. 75, n.1, p. 51-58, 2017.

MARTINI, M. et al. Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, n.1, p. 33-37, 2018.

MEDHAMMAR, E. et al. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 445-474, 2012.

MIAO, J. et al. Inhibitory effects of a novel antimicrobial peptide from kefir against *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 65, n.1, p. 63-72, 2016.

MIKUT, R. et al. Improving short antimicrobial peptides despite elusive rules for activity. **Biochemical et Biophysical Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1858, n. 5, p. 1024-1033, 2016.

MIN, S., HARRIS, L. J., KROCHTA, J. M. Antimicrobial effects of lactoferrin, lysozyme, and the lactoperoxidase system and edible whey protein films incorporating the lactoperoxidase system against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Science**, v. 70, 332–338, 2005.

MOCANU, G.D. et al. Characterization of probiotic yoghurt obtained with medicinal plant extracts and modelling of bacteria cell growth during its production. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 17, p. 65-71, 2011.

MOHANTY, D. P. et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health—A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 577-583, 2016.

MOHANTY, D. et al. Milk derived antimicrobial bioactive peptides: a review. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 4, p. 837-846, 2016A.

MONTI, G. et al. Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: an in vivo and in vitro study. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 18, n. 3, p. 258-264, 2007.

MORENO-MONTORO, M. et al. Antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activity of fermented goat milk: activity and physicochemical property relationship of the peptide components. **Food & Function**, v. 8, n.1, p. 2783-2791, 2017.

MORTIMER, G. M.; MINCHIN, R. F. Cryptic epitopes and functional diversity in extracellular proteins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 81, p. 112-120, 2016.

MUDGIL, P. et al. Molecular binding mechanism and identification of novel antihypertensive peptides from camel milk protein hydrolysates. **Food Science and Technology**, v. 112, n. 1, p. 108193, 2019.

MUHIALDIN, B. J.; ALGBOORY, H. L. Identification of low molecular weight antimicrobial peptides from Iraqi camel milk fermented with *Lactobacillus plantarum*. **PharmaNutrition**, v. 6, n. 2, p. 69-73, 2018.

MURGIA, A. et al. Characterization of donkey milk and metabolite profile comparison with human milk and formula milk. **Food Science and Technology**, v. 74, n.1, p. 427-433, 2016.

NAGHMOUCHI, K., et al. Detection of pediocin PA-1 in food matrices using specific polyclonal antibodies. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 2, p. 175-177, 2007.

NAZARI, S. H. Sonicated date syrup media preparation for microbial culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 424-432, 2011.

NIELSEN, S. D. et al. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. **Food Chemistry**, v. 232, n.1, p. 673-682, 2017.

NONGONIERMA, A. B.; O'KEEFFE, M. B.; FITZGERALD, R. J. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: **Advanced Dairy Chemistry**. Springer, New York, NY, 2016. p. 417-482.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. **Journal of Functional Foods**, v. 17, n.1, p. 640-656, 2015.

NORDSTRÖM, R. et al. Membrane interactions of microgels as carriers of antimicrobial peptides. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 513, p. 141-150, 2018.

OMS. Estrategia para combater a Resistencia de bacterias à antibioticos. **Organização Mundial de Saúde**. 2019 disponível em: <<https://nacoesunidas.org/oms-lanca-estrategia-para-combater-resistencia-de-bacterias-a-antibioticos/>>. Acesso em: 25 de Fev de 2020.

OOI, L-G.; LIONG, M-T. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 6, p. 2499-2522, 2010.

FAO. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, 2019.

PANE, K. et al. Antimicrobial potency of cationic antimicrobial peptides can be predicted from their amino acid composition: Application to the detection of "cryptic" antimicrobial peptides. **Journal of Theoretical Biology**, v. 419, n.1, p. 254-265, 2017.

PELLEGRINI, A. Antimicrobial peptides from food proteins. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1225-1238, 2003.

PEPE, G. et al. Antioxidant peptides released from gastrointestinal digestion of "Stracchino" soft cheese: Characterization, *in vitro* intestinal protection and bioavailability. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 494-505, 2016.

PEPE, G. et al. Susceptibility to denaturation of caseins in milk samples for improving protein conformational study and their identification. **Natural Product Research**, v. 27, n. 16, p. 1508-1512, 2013.

PERNA, A. et al. Donkey milk for manufacture of novel functional fermented beverages. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 6, p. S1352-S1359, 2015.

PETRAT-MELIN, B. et al. *In vitro* gastrointestinal digestion of purified bovine kappa-casein variants A, B, and E: Effects on antioxidant and angiotensin 1-converting enzyme inhibitory capacity. **International Dairy Journal**, v. 57, n.1, p. 44-51, 2016.

PIOVESANA, S. et al. Peptidome characterization and bioactivity analysis of donkey milk. **Journal of Proteomics**, v. 119, n.1, p. 21-29, 2015.

PRIMO, A.T. América: conquista e colonização. A fantástica história dos conquistadores ibéricos e seus animais na era dos descobrimentos. Movimento, Porto Alegre, Brazil (2004).

RANI, S.; POOJA, K.; PAL, G. K. Exploration of potential angiotensin converting enzyme inhibitory peptides generated from enzymatic hydrolysis of goat milk proteins. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, n.1, p. 83-88, 2017.

REDDY, L. V.; MIN, J-H.; WEE, Y-J. Production of probiotic mango juice by fermentation of lactic acid bacteria. **Microbiology and Biotechnology Letters**, v. 43, n. 2, p. 120-125, 2015.

REN, T. et al. Synthesis of antimicrobial peptide-grafted graphene oxide nanosheets with high antimicrobial efficacy. **Materials Letters**, v. 235, n.1, p. 42-45, 2019.

RIZZELLO, C. G. et al. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. **Journal of Functional Foods**, v. 27, n.1, p. 549-569, 2016.

RIZZELLO, C. G. et al. Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, n.1, p. 252-261, 2017.

SAADI, S. et al. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 80-116, 2015.

SALIMEI, E.; FANTUZ, F. Equid milk for human consumption. **International Dairy Journal**, v. 24, n. 2, p. 130-142, 2012.

SALMERÓN, I.; THOMAS, K.; PANDIELLA, S. S. Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. **Journal of Functional Foods**, v. 15, n.1, p. 106-115, 2015.

SANCHEZ, B. et al. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 1, p. 1600240, 2017.

SAVIJOKI, K; INGMER, H.; VARMANEN, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 4, p. 394-406, 2006.

SOLEYMANZADEH, N. et al. Novel β -casein derived antioxidant and ACE-inhibitory active peptide from camel milk fermented by *Leuconostoc lactis* PTCC1899: Identification and molecular docking. **International Dairy Journal**, v. 97, n.1, p. 201-208, 2019.

SULTAN, S. et al. Therapeutic potential of dairy bioactive peptides: A contemporary perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 105-115, 2018.

TAGLIAZUCCHI, D. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by *in vitro* gastro-intestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 71, n.1, p. 6-16, 2017.

TAGLIAZUCCHI, D. et al. Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides during *in vitro* gastro-intestinal digestion of camel milk. **International Dairy Journal**, v. 56, n.1, p. 119-128, 2016.

TIDONA, F. et al. Antimicrobial effect of donkeys' milk digested *in vitro* with human gastrointestinal enzymes. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 3, p. 158-165, 2011.

TURBAY, MB Espeche et al. β -Casein hydrolysate generated by the cell envelope-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 581 protects against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1108-1118, 2012.

TURCHI, Barbara et al. *Lactobacillus plantarum* and *Streptococcus thermophilus* as starter cultures for a donkey milk fermented beverage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 256, p. 54-61, 2017.

UDENIGWE, C. C., ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. R11–R24, 2012.

VÁSQUEZ-VILLANUEVA, R. et al. *In vitro* antitumor and hypotensive activity of peptides from olive seeds. **Journal of Functional Foods**, v. 42, n. 1, p. 177-184, 2018.

WANG, B. et al. Isolation and characterisation of five novel antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of spotless smoothhound (*Mustelus griseus*) muscle. **Journal of Functional Foods**, v. 6, n.1, p. 176-185, 2014.

WU, Nan et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Lactobacillus delbrueckii* QS306 fermented milk. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 7, p. 5913-5921, 2019.

XUE, Z. et al. Preparation and antioxidative properties of a rapeseed (*Brassica napus*) protein hydrolysate and three peptide fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5287-5293, 2009.

YANGILAR, F. As a potentially functional food: Goats' milk and products. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 1, n. 4, p. 68-81, 2013.

ZHANG, L.; LI, J.; ZHOU, K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial protease and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2084-2089, 2010.

ZHANG, X-Y. et al. The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. **Food Control**, v. 19, n. 12, p. 1191-1195, 2008.

ZHOU, Q-J. et al. Molecular structure, expression and antibacterial characterization of a novel antimicrobial peptide NK-lysin from the large yellow croaker *Larimichthys crocea*. **Aquaculture**, v. 500, n.1, p. 315-321, 2019.

CAPÍTULO I

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO

Número do Processo: BR 10 2020 018367 2



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 018367 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: inovacao@ufrpe.br;luis.bezerrasilva@ufrpe.br

PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 09/09/2020 às
15:19, Petição 870200114195

CAPÍTULO II

Avaliação das propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-hipertensivas e citotóxicas dos peptídeos do leite de jumenta antes e após a digestão *in vitro*



ISSN: 0963-9969 / 3.579 Fator de Impacto

Artigo a ser submetido à revista "FOOD RESEARCH INTERNATIONAL"

Avaliação das propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-hipertensivas e citotóxicas dos peptídeos do leite de jumenta antes e após a digestão *in vitro*

Karoline Mirella Soares de Souza^a, Rogelio Moreno Santisteban^b, Tania Maria Sarmiento da Silva^b, Marlllyn Marques da Silva^c, Mariane Cajubá Britto Lira Nogueira^c, Ana Lúcia Figueiredo Porto^a, Meire dos Santos Falcão de Lima^a, Maria Taciana Holanda Cavalcanti^a.

^a Laboratório de Tecnologia de Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s / n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

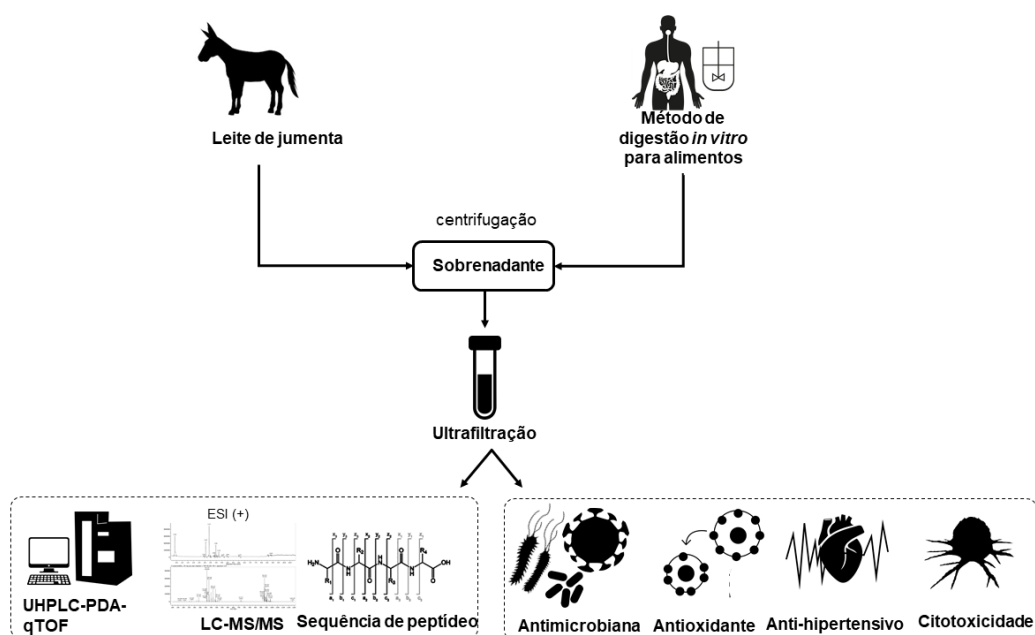
^b Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s / n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

^c Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

* Autor correspondente: Laboratório de Tecnologia de Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s / n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail address: mtcvsoares@yahoo.com.br

RESUMO GRÁFICO



1. Introdução

Nas últimas décadas, houve um grande interesse na redescoberta do leite de jumenta, devido a sua composição físico-química similar com o leite humano, e difere de forma considerável das demais espécies leiteiras (Aspri, Economou e Papademas, 2017). Associado a isso, apresentam propriedades terapêuticas tais como as atividades antimicrobiana, antioxidante, antiviral, anti-inflamatória e imunomodulatórias, sendo estas, atribuídas a sua composição proteica do leite *in natura* (Brumini et al., 2016; Tidona et al., 2011).

Devido as evidências, as investigações foram concentradas na bioatividade da fração proteicas do leite e seu uso potencial em formulações de alimentos. Nesse aspecto, destaca-se principalmente a β -lactalbumina, lisozima e lactoferrina e fonte de peptídeos bioativos (PBA) (Cunsolo et al., 2017).

Os PBA são inativos, e podem ser liberados da proteína precursora por proteólise enzimática e/ ou digestão gastrointestinal (Korhonen, 2009), com bioatividade dependente da composição e sequência de aminoácidos: eles podem exercer atividades biológicas distintas, como ação antimicrobianas, anti-hipertensivas, antioxidantes, antitrombóticas, imunomodulatórias e opióides (Nongonierma e FitzGerald, 2015).

A bioatividade de peptídeos criptografados nas proteínas do leite cru de jumenta foi estudada após separação em acetona apresentando propriedade antioxidante e anti-hipertensiva (Chiozzi, et al., 2016) e após digestão enzimática, com propriedades antimicrobianas *in vitro* (Piovesana et al., 2015; Tidona et al., 2011).

De acordo com a literatura pouco se sabe sobre as possíveis bioatividades do leite de jumenta após simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*, principalmente quando se trata do leite de jumenta do Nordeste brasileiro e das propriedades bioativas de seus extratos peptídicos. Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar a composição de peptídeos oriundos do leite de jumenta antes e após digestão *in vitro*, para elucidar as propriedades antimicrobianas, anti-hipertensivas, antioxidantes e citotoxicidade a fim de proporcionar benefícios à saúde de seus consumidores.

2. Materiais e métodos

2.1 Leite de jumenta

O leite cru de jumentas foi cedido por um criador local localizado em Vitória de Santo Antão-PE/Brasil. O material foi coletado e transportado sob condições de temperatura controlada para o Laboratório de Tecnologia de Bioativos – LABTECBIO, localizado no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal–DMFA–UFRPE/SEDE. Alíquotas do leite cru foram avaliadas quanto à composição química dos conteúdos de (gordura, proteína total, caseína, lactose e sólidos totais), realizado no Laboratório PROGENE- UFRPE.

2.2 Preparo das amostras

A pasteurização do leite de jumenta ocorreu sob agitação lenta a 65°C durante 30 min, posteriormente foi submetido à centrifugação a 3500 xg por 20 min a 4°C, como descrito por Gallina et al. (2016), e filtração em papel Whatman no. 40. Os sobrenadantes das amostras foram armazenados a -20 °C.

2.2.1 Digestão *in vitro*

As amostras do leite pasteurizado (LP) foram submetidas à digestão *in vitro* de acordo Egge et al., (2016) com o modelo desenvolvido pela ação COST FA1005 INFOGEST com modificações. De modo resumido, o protocolo é baseado no uso de três fluidos simuladores, saliva a pH 7 (SFS), fluido gástrico a pH 2 (SFG)

e fluido intestinal (duodenal) a pH 8 (SFI). Após a digestão, as amostras do LP e leite pasteurizado digerido (LPD) foram centrifugadas ($1000 \times g$, 10 min a 4°C) e ultrafiltradas em membranas *cut off* Amicon Ultra-15 com porosidade de 3kDa (BEZERRA et al. 2013). As digestões foram realizadas em triplicatas.

2.2.2 Determinação do teor de proteínas

A concentração de proteína foi determinada em triplicata de acordo com Smith et al. (1985) utilizando BCA Protein Assay Kit (Rockford, IL, EUA). As concentrações dos peptídeos usadas para análises biológicas foram padronizadas em 25, 12,5, 6,25 e 3,125 mg de cada amostra liofilizada por mL de água destilada. As amostras foram preparadas em água destilada estéril, centrifugada a $8000 \times g$, 4°C por 10 min, e o sobrenadante utilizado em todos os ensaios em triplicata.

2.3 Análise por UPLC-DAD-qTOF

Os experimentos analíticos de LC-MS/MS foram realizados utilizando-se um cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas sequencial Quadrupolo–ToF (Xevo G2-XS QToF, Waters, EUA) com ionização por eletrospray (ESI). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando-se uma coluna ACQUITY UPLC™ BEH C18 (2,1 x 50 mm, $1,7\mu\text{m}$, Waters, EUA) a 40°C . A fase móvel binária consistiu de uma solução aquosa de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O gradiente de eluição utilizado foi: 0.0-8.0 min, 10-50 % de B; 8,0-9,0 min, 50%-95% de B, com o fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5,0 μL . O monitoramento das análises foi realizado nos comprimentos de 290 e 320 nm (UPLC-DAD). O espectrômetro de massas foi operado em modo negativo e positivo de ionização (ESI^{-} e ESI^{+}) no modo sensibilidade, sendo a detecção realizada no método centróide MS^E em faixa de variação 50-1200 Da. A voltagem do capilar foi ajustada em 3,0 kV para ESI, gás de dessolvatação (N_2) 800 L.h^{-1} e 600°C , taxa do fluxo de gás do cone 100 L/h, temperatura da fonte 120°C , energia de colisão em rampa de 25-50 V. Todas as análises foram realizadas utilizando o lockspray para garantir a precisão e reprodutibilidade dos valores de massas. Leucina-encefalina (200,0 pg/mL) foi utilizado como padrão/referência para calibração. A aquisição e análise dos dados foram realizadas utilizando-se

o software Waters MassLynx. O software ProteoWizard foi utilizado na análise MS/MS para tentativa de identificação dos peptídeos.

2.4 Determinação da atividade antimicrobiana

As atividades antimicrobianas dos extratos peptídicos foram estimadas pelo método de acordo com o Comitê Nacional de Padrões Laboratoriais Clínicos (NCCLS, 2012). As bactérias utilizadas foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117. Os resultados das atividades antimicrobianas foram confirmados após seu crescimento em cada poço com caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Himedia®, Mumbai, Índia). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de Microplaca (BioteK Elx808) 600 nm.

2.5 Determinação da atividade antioxidante usando o método ABTS e o método DPPH

O método antioxidante usando o radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico foi determinado pelo ensaio de descoloração, como descrito por Re et al. (1999) com algumas modificações. O cátion do radical 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS⁺) foi produzido misturando a solução mãe ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM e mantendo a mistura no escuro por 12–16 h antes do uso. A solução foi então diluída em tampão fosfato salina pH 7.5 para atingir um valor de absorbância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm, determinada por espectrofotômetro (VWR® - UV-1600PC).

O método antioxidante usando solução radicalar 1,1-difenil-2-picril-hidrazil foi estimado seguindo os métodos de Zubia et al. (2009), com modificações. Foi utilizado 30 µl do extrato peptídico em 970 µl da solução radicalar. A absorbância de cada amostra a 517 nm determinada por espectrofotômetro (VWR® - UV-1600PC).

O trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametricroman-2-carboxílico (Sigma-Aldrich Chemie, Brasil) foi utilizado como padrão de referência em ambos os experimentos. Uma curva de calibração foi plotada (redução de absorbância / concentração da solução padrão Trolox). A capacidade de eliminação ABTS e DPPH das amostras de teste foi expressa em milimol de capacidade antioxidante equivalente (TEAC) Trolox por 100 mL de amostra (mmol TEAC /100 mL).

2.6 Determinação da atividade anti-hipertensiva

A atividade inibidora da enzima de conversão da angiotensina dos extratos peptídicos foi avaliada *in vitro* pelo método de Cushman e Cheung (1971), com algumas modificações recomendadas por Meira et al. (2012). Este método utiliza a enzima conversora de angiotensina (ECA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e o substrato Hippuryl-Histidyl-Leucine (HHL) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). A absorbância foi detectada a 215 nm (VWR® - UV-1600PC), e resultados de inibição expressa em IC₅₀. O captopril foi utilizado como referência na determinação da inibição da ECA.

2.7 Determinação da atividade citotóxica

As linhagens celulares J774.A1 (macrófagos), MDA-MB-231 (adenocarcinoma humano da glândula mamária) e S-180 (uma linhagem heterogênea de células de tumor de camundongos de origem mesodérmica) foram utilizadas para avaliação da viabilidade celular (DEBNATH et al., 2017). As células J774.A1 e S-180 foram cultivadas em meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (10%) e penicilina-estreptomicina (1%) a 37 °C e 5% de CO₂; e a cultura MDA-MB-231 foi mantida em meio de cultura L-15 de Leibovitz e F-12 (proporção de 50% de cada meio) com L- glutamina 2 mM, sem bicarbonato de sódio e soro bovino fetal a uma concentração final de 10% com ausência de CO₂. As células foram contabilizadas em câmara de Neubauer para o teste de viabilidade celular. Para determinar a citotoxicidade frente aos extratos peptídicos obtidos do leite de jumenta, um ensaio de MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) foi utilizado segundo MOSSMAN, 1983. As células foram inoculadas em placas de 96 poços: J774 a 1x10⁵ células/mL, S-180 a 1x10⁶ células/mL e MDA a 1x10⁴ células/mL. Após 24h de crescimento celular, as células foram tratadas com os extratos peptídicos solubilizados em salina ao cultivo celular nas concentrações finais de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, durante mais 24 h de crescimento. Após esse período de tratamento, 20 µL de solução de MTT (4mg/mL) foi adicionado em cada poço, e as placas foram incubadas durante 2:30 h. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e adicionados 100 µL de DMSO (Dimethylsulfoxide). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de Microplaca (BioteK Elx808) 630 nm. A citotoxicidade foi expressa em viabilidade celular segundo Santos et al. (2005).

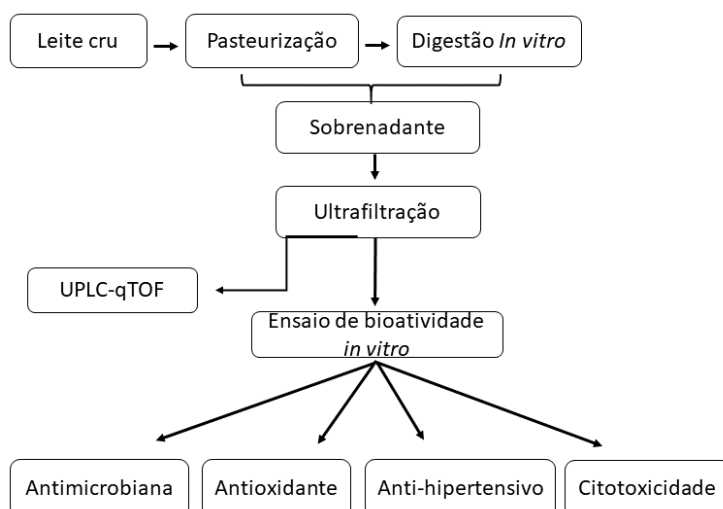
$$\text{Citotoxicidade \%} = \frac{\text{Abs da população trada} \times 100}{\text{Abs da população célula não tratada}}$$

2.8 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada no Programa GraphPad Prisma 8.3.0. Os dados foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) para determinar as diferenças entre as amostras. Diferenças significativas foram comparadas pelo teste de Turkey e Bonferroni no nível de $P < 0,05$.

3. Resultados

Figura 1. Fluxograma experimental das análises com o leite de jumenta pasteurizado



3.1 Análise por UPLC-DAD-qTOF

A análise por UPLC-DAD-QTOF das amostras obtidas de leite de jumenta não digeridas (LP) e digeridas (LPD) foi realizada no modo de ionização eletrospray negativo e positivo. Isto permitiu obter mais informações sobre as possíveis estruturas dos constituintes químicos, sendo identificados dez peptídeos principais.

Nas amostras não digeridas, não foi possível identificar a sequência de aminoácidos devido ao alto peso molecular das proteínas (acima de 1200 Da). O perfil químico das amostras LP e LPD é mostrado na Figura 2 A e B respectivamente. As análises dos cromatogramas dos íons pico base obtidos

tanto no modo positivo quanto negativo, permitiu identificar os dez principais peptídeos nas amostras (Tab. 1 e 2). Os espectros de massas dos peptídeos estão no material suplementar I.

Figura 2. Cromatogramas de função de baixa energia de colisão obtidos no modo MS^E com ionização por eletrospray positivo (ESI⁺) (A1 e A2) eletrospray negativo (ESI⁻) (B1 e B2) usando UPLC-qTOF das amostras LP (A) e LPD (B)

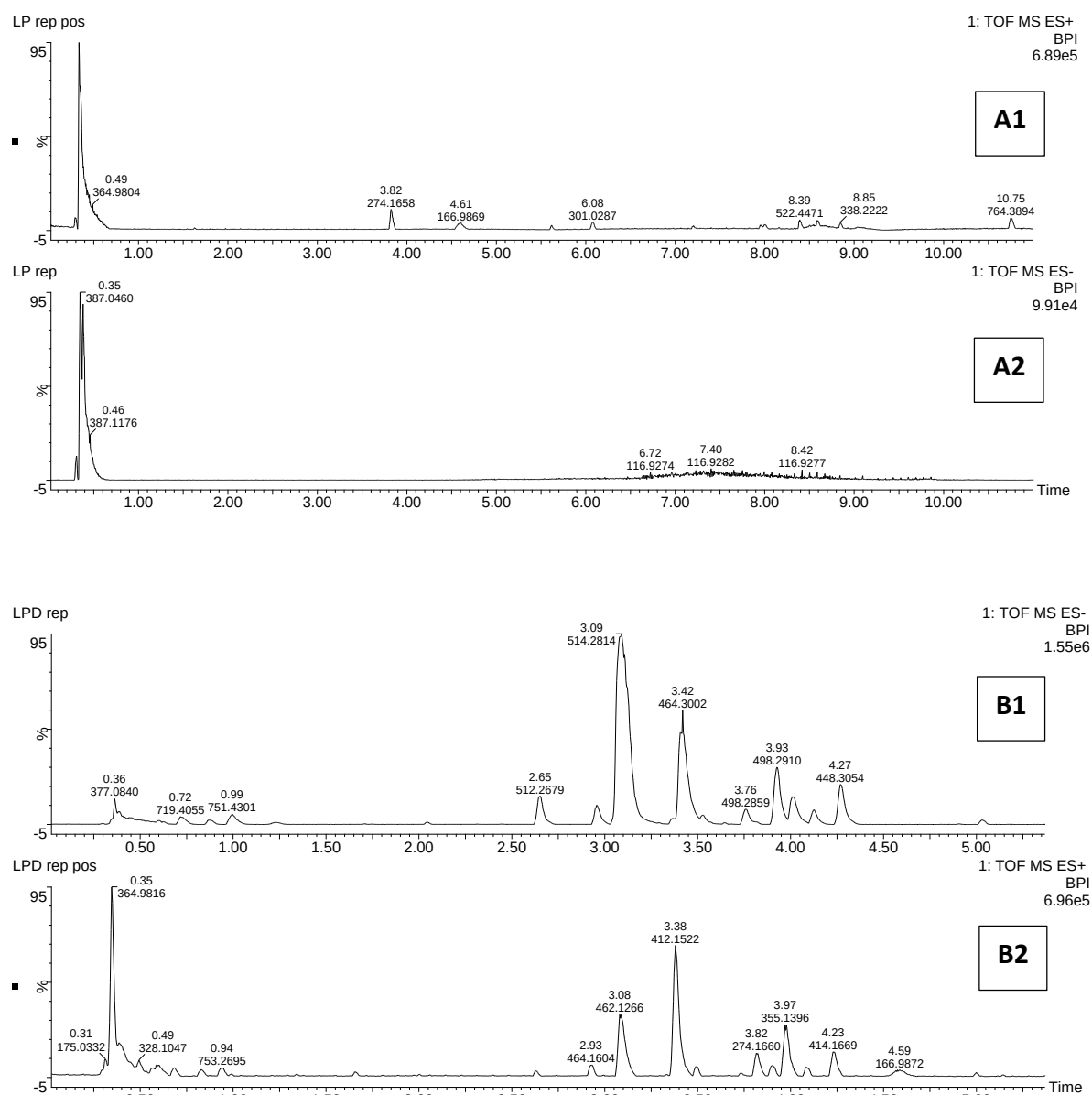


Tabela 1. Peptídeos identificados na amostra de leite de jumenta pasteurizado digerido (LPD) por UPLC-DAD-QTOF MS/MS em modo positivo

	TR (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z) Calculado	Δm _i erro em ppm	MS/MS	Possível fragmento
1	2.62	514.2732	514.2732	0.0000	496.1280 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 478.1205 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 460.1096 [M+H-H ₂ O] ⁺	HEKT ; His-Glu-Lys-Thr-; EHKT ; Glu-His-Lys-Thr
2	2.92	464.1624	464.1623	0.2154	446.1528 [M+H-H ₂ O] ⁺ ; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 428.1448; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 410.1376	DNDT ; Asp-Asn-Asp-Thr ESDN ; Glu-Ser-Asp-Asn
3	3.08	516.2190	516.2201	-2.1308	[M+H-H ₂ O] ⁺ ;498.1421; [M+H-H ₂ O] ⁺ ;480.1344; [M+H-H ₂ O] ⁺ ;462.1266	SSWH ; Ser-Ser-Trp-His
4	3.40	466.2325	466.2330	-1.0724	[M+H-H ₂ O] ⁺ ;448.1672; [M+H-H ₂ O] ⁺ ;430.1596; [M+H-H ₂ O] ⁺ ;412.1522	TSKM ; Thr-Ser-Lys-Met;
5	3.50	407.1418	407.1409	2.2105	[M+H-H ₂ O] ⁺ ;389.1409; [M+H-H ₂ O] ⁺ ;371.1333; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 353.1259; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 335.1191	ESGD ; Glu-Ser-Gly-Asp SDGE ; Ser-Asp-Gly-Glu
6	3.83	500.1600	500.1632	-6.3979	[M+H-H ₂ O] ⁺ ; 482.1493; [M+H-H ₂ O] ⁺ ;464.1426	DHDN ; Asp-His-Asp-Asn
7	3.90	500.1600	500.1632	-6.3979	[M+H-H ₂ O] ⁺ ; 482.1493; [M+H-H ₂ O] ⁺ ;464.1426	DHDN ; Asp-His-Asp-Asn
8	4.00	409.1565	409.1565	0.0000	[M+H-H ₂ O] ⁺ ;391.1556; [M+H-H ₂ O] ⁺ ;373.1468; [M+H-H ₂ O] ⁺ ;355.1396	ESSS ; Glu-Ser-Ser-Ser; SSDT ; Ser-Ser-Asp-Thr
9	4.10	450.1835	450.1831	0.8885	[M+H-H ₂ O] ⁺ ;432.1752; [M+H-H ₂ O] ⁺ ;414.1671	NEST ; Asn-Glu-Ser-Thr; SNET ; Ser-Asn-Glu-Thr; SQES ; Ser-Gln-Glu-Ser
10	4.23	450.1835	450.1831	0.8885	[M+H-H ₂ O] ⁺ ;432.1752; [M+H-H ₂ O] ⁺ ;414.1671	NEST ; Asn-Glu-Ser-Thr; SNET ; Ser-Asn-Glu-Thr; SQES ; Ser-Gln-Glu-Ser

Tabela 2. Peptídeos identificados na amostra de leite de jumenta pasteurizado digerido (LPD) por UPLC-DAD-qTOF em modo negativo

	RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z) Calculado	Possível fragmento
1	2.62	512.2664	512.2661	HEKT ; His-Glu-Lys-Thr-; EHKT ; Glu-His-Lys-Thr
2	2.92	462.2722	462.2722	DNDT ; Asp-Asn-Asp-Thr; ESDN ; Glu-Ser-Asp-A
3	3.08	514.2819	514.2817	SSWH ; Ser-Ser-Trp-His
4	3.40	464.2180	464.2184	TSKM ; Thr-Ser-Lys-Met;
5	3.52	405.2507	405.2507	ESGD ; Glu-Ser-Gly-Asp; SDGE ; Ser-Asp-Gly-Glu
6	3.73	498.2722	498.2722	DHDN ; Asp-His-Asp-Asn
7	3.92	498.2869	498.2722	DHDN ; Asp-His-Asp-Asn
8	4.00	407.1420	407.1420	ESSS ; Glu-Ser-Ser-Ser; SSDT ; Ser-Ser-Asp-Thr
9	4.10	448.1685	448.1685	NEST ; Asn-Glu-Ser-Thr; SNET ; Ser-Asn-Glu-Thr; SQES ; Ser-Gln-Glu-Ser
10	4.23	448.1685	448.1685	NEST ; Asn-Glu-Ser-Thr; SNET ; Ser-Asn-Glu-Thr; SQES ; Ser-Gln-Glu-Ser

Os espectros obtidos no modo positivo apresentaram peptídeos com adutos de sódio $[M+Na]^+$ e potássio $[M+K]^+$, além íons produtos na forma ionizada $[M+H]^+$. Nos espectros de massas foram observadas íons produtos com perdas neutras de duas e três moléculas de água (Tab. 1) que pode ser devido a presença de peptídeos contendo os aminoácidos Serina e Treonina (HARRISON, 2011; NETA et al., 2007).

Através dos espectros de massas MS^2 foi possível identificar a sequência dos aminoácidos pelas informações obtidas dos fragmentos referentes as quebras da ligação peptídica *b* e *y* e utilizando programa ProteoWizard.

Nos espectros obtidos em modo negativo foi possível observar os picos dos íons moleculares desprotonados $[M-H]^-$ (Tab. 2), permitindo identificar a sequência de peptídeos na amostra com uma maior certeza. Os íons produtos observados nos espectros de massas MS^2 depende de vários fatores como a sequência dos aminoácidos nos peptídeos, quantidade de energia aplicada na obtenção dos espectros, cargas dos peptídeos, etc. (ROEPSTORFF; FOHLMAN, 1984; JOHNSON et al., 1987).

No resultado dos espectros de baixa energia com as perdas de água quando comparado com a literatura que pode ser a presença de Serina, Treonina ou ácido carboxílico (Aspartato e Glutamato), foram encontrados esses aminoácidos na sequencias peptídicas do leite de jumenta (ASPRI et al., 2018).

3.2 Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3, onde pode ser observado que o leite pasteurizado se mostrou eficiente em todas as concentrações usadas para inibir o crescimento dos microrganismos avaliados. Após digestão, mediante as concentrações peptídicas utilizada, ocorreu apenas a inibição das cepas Gram-positivas.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos peptídeos do leite de jumenta pasteurizado antes e após digestão *in vitro*

Amostra	Extrato mg/mL	Microrganismos		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ^b	<i>Escherichia coli</i> ^a	<i>Listeria monocytogenes</i> ^a
LP	25	+	+	+
	12,500	+	+	+
	6,250	+	+	+
	3,125	+	+	+
LPD	25	+	-	+
	12,500	+	-	+
	6,250	+	-	+
	3,125	+	-	+

Os símbolos (+) e (-) representam a presença ou ausência de atividade antimicrobiana. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. LP (Leite pasteurizado) e LPD (Leite pasteurizado digerido).

Peptídeos com ação antimicrobiana obtidos a partir de proteínas lácteas apresentam uma grande vantagem por serem produzidos a partir de fontes seguras, baratas e de fácil acesso ao consumo. Além do interesse crescente na utilização desses peptídeos como bioconservantes em auxílio a qualidade alimentar ou como suplementos alimentares na indústria alimentícia (Kumar et al., 2016b).

Essa ação antimicrobiana pode estar associada à alta concentração de lactoferrina e lisozima, proteínas responsáveis pelo chamado sistema de proteção do leite, que são substâncias capazes de matar microrganismos (Cosentino et al., 2016) pois, já foi descrito que a lisozima resiste à degradação por enzimas gastrointestinais (Tidona et al., 2011; Aspri et al., 2018).

Após o processamento da digestão *in vitro*, foi observada uma diminuição na efetividade dos extratos peptídicos testados, principalmente relacionado à bactéria Gram-negativa. Provavelmente esse fato indica que as enzimas digestivas podem ter degradado, e os peptídeos gerados não possuem a capacidade antimicrobiana suficiente, em virtude da membrana externa das bactérias Gram-positivas impedirem o acesso à camada de peptidoglicano, dificultando a ruptura (Sahoo et al., 2012).

Tidona et al. (2011) relatou em seus estudos a inibição da *Listeria monocytogenes* utilizando leite de jumenta digerido por enzimas gastrintestinais humanas. Perfil similar aos resultados do presente estudo que podem ser observados na tabela 3, na qual o leite de jumenta antes e após digestão também apresentou inibição frente a referida bactéria com diferentes concentrações peptídicas.

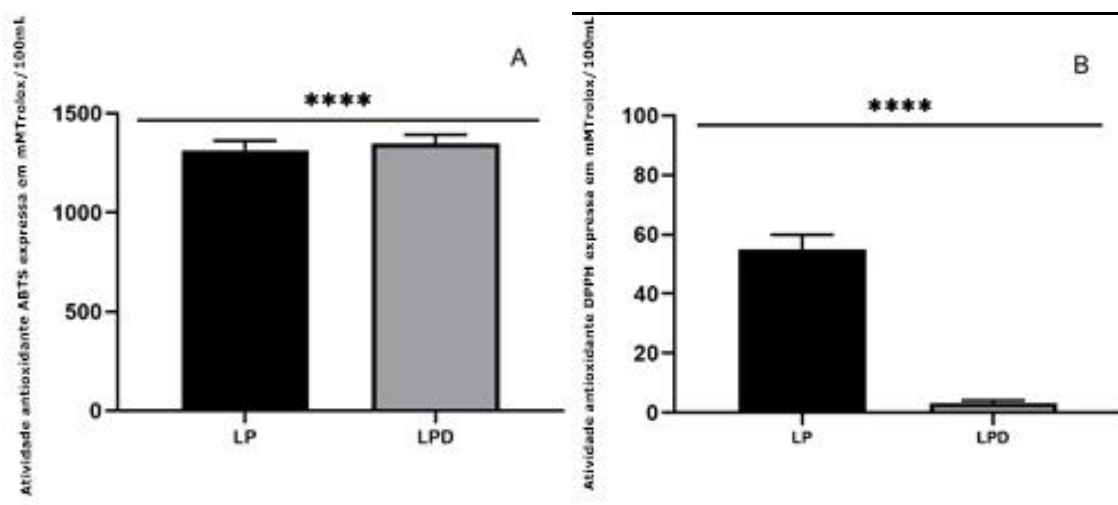
Kumar et al. (2016a) demonstrou atividade antimicrobiana da caseína do leite de camela após hidrólise com quimotripsina frente a *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Semelhante aos resultados encontrados no presente estudo, antes e após digestão *in vitro*.

Os resultados desta análise demonstraram que o leite de jumenta apresenta diferentes compostos, entre eles peptídeos que mesmo após a digestão *in vitro* ainda apresentaram a atividade antimicrobiana. Vale a pena salientar que este efeito benéfico no organismo pode ser aumentado quando administrados na forma de um derivado lácteo com maior teor proteico, ou com a inclusão de bactérias probióticas.

3.3 Atividade antioxidante

Neste estudo, as atividades antioxidantes dos extratos peptídicos do leite de jumenta, bem como as amostras após digestão gastrointestinal, foram avaliadas pelos ensaios dos radicais ABTS e DPPH (Fig. 3). Os extratos peptídicos avaliados apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre as amostras ($p < 0,05$).

Figura 3. Atividade antioxidante dos peptídeos do leite de jumenta pasteurizado antes e após digestão *in vitro* pelo método ABTS e DPPH



Atividade antioxidante por ABTS (A) e DPPH (B) expressos em mmol de Trolox/100mL. LP (Leite pasteurizado) e LPD (leite pasteurizado digerido). Diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA *P < 0,05. Cada valor determina a média $\pm$ SD de tres experimentos independentes.

Os resultados do ensaio com ABTS utilizando diferentes tratamentos são apresentados na Figura 3A. Com base na atividade de eliminação de radicais ABTS, a atividade antioxidante dos peptídeos do leite de jumenta pasteurizado foi 1313,95 mmol de Trolox/100 mL, apresentando uma leve elevação na atividade antioxidante após digestão *in vitro* com 1348,39 mmol de Trolox/100 mL.

Os achados para o ensaio DPPH com as amostras do leite pasteurizado e pasteurizado digerido são apresentados na Fig. 3B. Apresentou atividade frente ao radical DPPH com 55,00 mmol de trolox/100 mL, diminuindo a capacidade antioxidante após digestão *in vitro* com 7,98 mmol de trolox/100 mL.

Com base na atividade de eliminação de radicais ABTS, Aspri et al. (2018) utilizando peptídeo solúveis em água do leite de jumenta cru e pasteurizado obtiveram 46,41 e 45,30 mmol de Trolox/100 mL, respectivamente. No presente estudo foi obtido resultados superiores na atividade antioxidante por ABTS utilizando leite de jumenta pasteurizado 1313,95 mmol de trolox/100 mL.

Após a digestão *in vitro*, é possível observar que a atividade antioxidante aumentou, provavelmente devido a liberação de peptídeos com maior capacidade de captura de radicais e/ou em melhor quantidade quando

comparado ao leite antes da digestão (Fig. 3A). Já está bem descrito que isso acontece, Aspri et al. (2018) mostrou que o leite de jumenta após digestão *in vitro* apresentou melhor captura de radicais, principalmente pelo método por ABTS, quando comparado ao DPPH, resultado similar ao nosso estudo (Fig. 3B).

Perna, Simonetti e Gambacorta (2016) demonstraram que a capacidade antioxidante da caseína do leite bovino aumentou durante a digestão *in vitro* com enzimas gastrointestinais, e Salami et al. (2010) constataram melhor ação antioxidante de peptídeos < 3 kDa obtidos do soro de camelo e bovino após proteólise enzimática, além de Ibrahim et al. (2018) observaram em resultados da atividade antioxidantes utilizando proteínas do leite de camela poderiam ser amplificadas após hidrólise com enzimas digestivas. Assim os resultados utilizando leite de jumenta antes e após digestão *in vitro* estão de acordo com os estudos anteriores utilizando diferentes fontes lácteas.

Contudo, existe uma correlação fraca entre os resultados de DPPH e ABTS ambos os ensaios apresentaram uma ordem semelhante, ou seja, dependendo do método usado os resultados diferiram conforme mostrado na Fig. 3B, o leite de jumenta pasteurizado digerido exibiram capacidade antioxidante mais baixa pelo ensaio por DPPH em comparação com o ensaio ABTS (Fig. 3A), comprovando que a proteção fornecida pelo composto antioxidante depende da sua concentração, mas principalmente determinada por diferentes métodos (Bittencourt et al., 2015), mecanismos de eliminação de radicais, à presença de diferentes peptídeos liberados a cada etapa de tratamento nas amostras capazes de reagir frente aos radicais e à diferença da sensibilidade dos métodos.

As diferenças no mecanismo de ação dos ensaios utilizados, além de fatores cruciais envolvidos na interação de moléculas reativas e antioxidantes (por exemplo, solubilidade e afinidade) interferirem diretamente nos resultados (Karadag, Ozcelik e Saner et al., 2009). A diferença entre o DPPH e o ABTS deve-se principalmente ao solvente empregado, pois o DPPH exerce afinidade com compostos hidrofílicos, e é apenas dissolvido em meios orgânicos, o que pode levar à precipitação de proteínas (Tang et al., 2009), interferindo na sua capacidade de ação antioxidante, isso foi observado no presente estudo, além de relatos expostos por Aspri et al. (2018). Por outro lado, o ABTS interage com

ambos os compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, e seu radical pode ser solúvel em água ou em soluções orgânicas (Barba et al., 2013).

3.4 Atividade Anti-hipertensiva

Nos ensaios de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), os resultados demonstraram que o leite pasteurizado obteve uma atividade em IC_{50} de $13,40 \pm 0,02$ mg/mL, enquanto que o leite pasteurizado digerido elevou a inibição da atividade anti-hipertensiva ao diminuir sua concentração peptídica utilizando $10,81 \pm 1,4$ mg/mL, valor inferior quando comparado aos resultados da IC_{50} ($273,0 \pm 27,9$ mg/mL) com leite de jumenta após digestão obtido por Bidasolo et al. (2012).

A melhor inibição da ECA foi encontrada quando utilizada a menor concentração do extrato peptídico quando comparado ao leite de jumenta não digerido, perfil similar aos estudos de Aspri et al. (2018) que utilizaram leite de jumenta e constataram que a melhor inibição da ECA ocorreu numa menor concentração de peptídeos $IC_{50} 2.71 \pm 2.52$ após digestão *in vitro*.

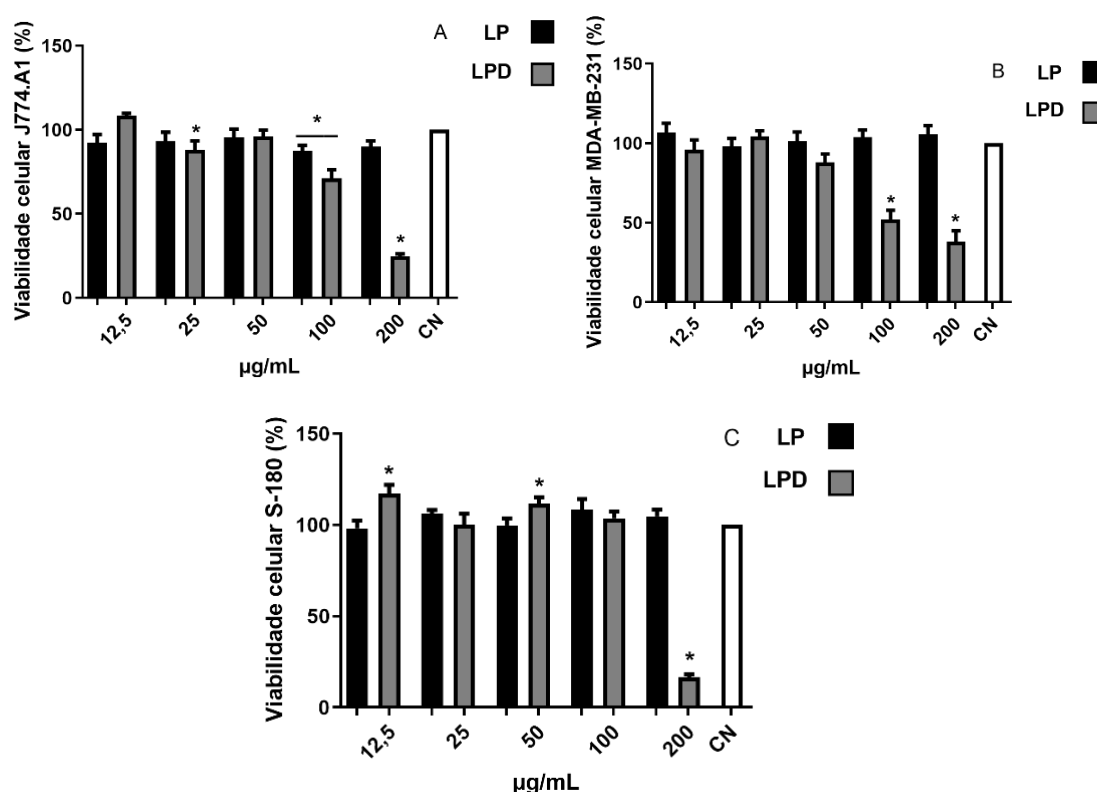
Alguns autores mostraram que diversas fontes lácteas a exemplo: leite de camela e de vaca (Maqsood et al., 2019) Caseína de leite de búfala (Li et al., 2020) e o leite de cabra (Tagliazucchi et al., 2017) apresentaram maior potencial inibidor da ECA após digestão gastrointestinal. O leite quando submetido a processo digestivo, estão susceptíveis a diferentes locais de clivagem pela ação de pepsina e pancreatina, sugerindo que a digestibilidade por enzimas gastrointestinais auxilie numa maior variabilidade de peptídeos (Tunick, et al., 2016). Ao apresentar perfil semelhante mediante a inibição da ECA após digestão *in vitro*, o nosso estudo está de acordo com a literatura quando comparada a diferentes fontes lácteas frente a inibição da ECA.

Assim, pode ser inferido que o leite de jumenta pasteurizado se caracteriza como um alimento rico em compostos com ação anti-hipertensiva, mantendo sua atividade após digestão *in vitro*.

3.5 Atividade de citotoxicidade

Os resultados da atividade citotóxica obtidos com os extratos peptídicos estão apresentados na Figura 4. Pode-se observar que os peptídeos presentes na amostra do leite pasteurizado em todas as concentrações usadas e todas as células testadas foram atóxicos, pois a viabilidade celular foi maior que 80%. Em relação a amostra do leite pasteurizado digerido, a partir da concentração de 100 µg/mL apresentou toxicidade para a linhagem celular MDA-MB-231, e a partir de 200 µg/mL para as linhagens celulares J774.A1 e S-180.

Figura 4. Viabilidade celular sob influência do leite de jumenta pasteurizado e digerido



Viabilidade celular J774.A1 (4A) macrófagos, MDA-MB-231 (4B) adenocarcinoma humano da glândula mamária e S-180 (4C) linhagem heterogênea de células de tumor de camundongos de origem mesodérmica com diferentes extratos peptídicos: LP (leite pasteurizado) e LPD (leite pasteurizado digerido) em. Diferenças estatísticas com controle foram determinadas pela ANOVA seguido de Bonferroni, *P < 0,05. Cada valor determina a média ± SD de dois experimentos independentes.

Mao et al. (2009) entre as suas análises comprovaram que soro de leite de jumenta pH 4.6 obtido após centrifugação, também pode estimular a atividade de proliferação de IL-2 (interleucinas) que pode ser produzida por macrófagos, e IFN-g (interferon), o que significa que a atividade antitumoral pode ser baseada em sua atividade imunomoduladora sem danificar as células de defesa. Em

nossos resultados o leite de jumenta antes a digestão manteve a viabilidade celular dos macrófagos J774.A1, e após a digestão essa viabilidade foi dependente da concentração empregada, pois a maior concentração peptídica foi tóxica a respectiva linhagem celular (Fig. 4A).

Contudo, mediante esses resultados é possível indagar que os peptídeos oriundos do leite pasteurizado digerido possam ser uma alternativa natural frente a *Mycobacterium tuberculosis*, microrganismo responsável pela tuberculose em humanos, pois é um patógeno intracelular facultativo que, na forma pulmonar da tuberculose, invade e persiste nos macrófagos (Lira et al., 2009), neste caso os peptídeos podem agir seletivamente frente as células infectadas.

Em relação as linhagens cancerígenas MDA-MB-231 e sarcoma S-180, a atividade citotóxica apresenta altas taxa de inibição, pois a partir de 100 µg/mL de concentração dos extratos peptídicos houve uma queda na viabilidade dessas células. Assim, esses extratos peptídicos precisam ser mais bem estudados para no futuro serem utilizados em terapia anticâncer.

O tratamento de células A549 (células epiteliais basais alveolares humanas do adenocarcinoma) com diferentes concentrações do soro de leite de jumenta pH 4.6 obtido após centrifugação diminuiu significativamente a viabilidade e o efeito antiproliferativo das células de maneira dependente da concentração e do tempo, com melhor atividade utilizando 800 µg/mL entre 48 e 72 h (Mao et al., 2009). Perfil similar aos resultados apresentados nesta pesquisa, contudo, utilizando uma menor concentração contendo 100 a 200 µg/mL do peptídeo após digestão *in vitro*, assim como menor tempo (24 h) para obtenção dos resultados frente as células MDA-MB-231 e S-180 (Fig. 4B e 4C).

A utilização de medicamentos e/ou suplementação de compostos à base de proteínas e peptídeos apresentam vantagens quando comparados as drogas sintéticas, pois elas podem apresentar fortes atividades biológicas com melhor biocompatibilidade, alta especificidade, baixa toxicidade e capacidade de penetração nas células tumorais (Thundimadathil et al., 2012). Assim, peptídeos bioativos podem ser considerados como uma nova alternativa em terapia contra células cancerígenas por exercer ação rápida, na inibição do desenvolvimento do tumor (Dissanayake et al., 2016). Seus mecanismos de ação consistem

no controle da angiogênese , interações proteína-proteína, vias de transmissão de sinal ou expressão gênica (Becucci et al., 2015).

4. Conclusão

No presente estudo, os peptídeos do leite de jumenta pasteurizado e submetido a digestão gastrointestinal *in vitro* foram analisados frente a diferentes atividades biológicas. O referido leite apresentou bons resultados frente as cepas bacterianas, ação antioxidante, anti-hipertensiva, assim como dependente da concentração empregada apresentou inibição frente a células cancerígenas, principalmente após digestão *in vitro*, demonstrando manter sua bioatividade após tratamento enzimático. Embora avaliadas *in vitro*, as bioatividades exibidas pelo leite de jumenta tornam este produto um alimento interessante e potencialmente funcional. Os resultados do presente estudo fornecem informações adicionais sobre as possíveis ações peptídicas, que podem explicar parcialmente as alterações do leite de jumenta entre a lactação, fornecendo uma percepção das potencialidades dele para o consumo. Além disso, tais peptídeos podem ser isolados, e servir como potenciais agentes na indústria alimentícia e farmacêutica.

Referências

- Aspri, M., Economou, N., & Papademas, P. (2017). Donkey milk: An overview on functionality, technology, and future prospects. *Food Reviews International*, 33(3), 316-333.
- Aspri, M., Leni, G., Galaverna, G., & Papademas, P. (2018). Bioactive properties of fermented donkey milk, before and after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 268, 476-484.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., Tedeschi, P., Brandolini, V., & Frígola, A. (2013). A comparative study of the analysis of antioxidant activities of liquid foods employing spectrophotometric, fluorometric, and chemiluminescent methods. *Food Analytical Methods*, 6(1), 317-327.
- Becucci, L., Benci, S., Nuti, F., Real-Fernandez, F., Vaezi, Z., Stella, L., ... & Papini, A. M. (2015). Interaction Study of Phospholipid Membranes with an N-Glucosylated β -Turn Peptide Structure Detecting Autoantibodies Biomarkers of Multiple Sclerosis. *Membranes*, 5(4), 576-596.
- Bezerra, V. S., Campos, J. F., Silva, R. A. D., Porto, T. S., Lima Filho, J. L. D., & Porto, A. L. F. (2013). Biotechnological richness of the northeastern semi-arid region: antioxidant activity of casein hydrolysates from Moxotó goat milk (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) obtained by papain action. *Food Science and Technology*, 33(3), 513-520.
- Bidasolo, I. B., Ramos, M., & Gomez-Ruiz, J. A. (2012). In vitro simulated gastrointestinal digestion of donkeys' milk. Peptide characterization by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *International Dairy Journal*, 24(2), 146-152.
- Bittencourt, M. L., Ribeiro, P. R., Franco, R. L., Hilhorst, H. W., de Castro, R. D., & Fernandez, L. G. (2015). Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Research International*, 76, 449-457.
- Brumini, D., Criscione, A., Bordonaro, S., Vegarud, G. E., & Marletta, D. (2016). Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. *Dairy Science & Technology*, 96(1), 1-14.
- Chiozzi, R. Z., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., La Barbera, G., Piovesana, S., Samperi, R., et al. (2016). Purification and identification of endogenous antioxidant and ACEinhibitory peptides from donkey milk by multidimensional liquid chromatography and nanoHPLC-high resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(20), 5657–5666.
- Cosentino, C. et al. (2016). Effects of different heat treatments on lysozyme quantity and antimicrobial activity of jenny milk. *Journal of Dairy Science*, v. 99, pp. 5173-5179.
- Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20(7), 1637-1648.
- Cunsolo, V., Saletti, R., Muccilli, V., Gallina, S., Di Francesco, A., & Foti, S. (2017). Proteins and bioactive peptides from donkey milk: The molecular basis for its reduced allergenic properties. *Food Research International*, 99, 41-57.

- Debnath, S., Karan, S., Debnath, M., Dash, J., & Chatterjee, T. K. (2017). Poly-L-lysine inhibits tumor angiogenesis and induces apoptosis in ehrlich ascites carcinoma and in sarcoma S-180 tumor. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 18(8), 2255.
- Dissanayake, S., Denny, W. A., Gamage, S., & Sarojini, V. (2017). Recent developments in anticancer drug delivery using cell penetrating and tumor targeting peptides. *Journal of Controlled Release*, 250, 62-76.
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., ... & Comi, I. (2016). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, 88, 217-225.
- Gallina, S., Cunsolo, V., Saletti, R., Muccilli, V., Di Francesco, A., Foti, S., ... & Roepstorff, P. (2016). Sequence characterization and glycosylation sites identification of donkey milk lactoferrin by multiple enzyme digestions and mass spectrometry. *Amino Acids*, 48(7), 1569-1580.
- Ibrahim, H. R., Isono, H., & Miyata, T. (2018). Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins. *Animal Nutrition*, 4(3), 273-280.
- Harrison, A. G. (2011). Pathways for water loss from doubly protonated peptides containing serine or threonine. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 23(1), 116-123.
- Holaskova, E., Galuszka, P., Frebort, I., & Oz, M. T. (2015). Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1005-1023.
- Johnson, R. S., Martin, S. A., Biemann, K., Stults, J. T., & Watson, J. T. (1987). Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Analytical chemistry*, 59(21), 2621-2625.
- Lira, M. C., Siqueira-Moura, M. P., Rolim-Santos, H. M., Galetti, F. C., Simioni, A. R., Santos, N. P., ... & Santos-Magalhães, N. S. (2009). In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *Journal of Liposome Research*, 19(1), 49-58.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41-60.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177-187.
- Kumar, D., Chatli, M. K., Singh, R., Mehta, N., & Kumar, P. (2016). Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Ruminant Research*, 139, 20-25A.
- Kumar, D., Chatli, M. K., Singh, R., Mehta, N., & Kumar, P. (2016)b. Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. *Dairy Science & Technology*, 96(3), 391-404B.
- Li, S., Hu, Q., Chen, C., Liu, J., He, G., Li, L., ... & Ren, D. (2020). Formation of bioactive peptides during simulated gastrointestinal digestion is affected by α s1-casein polymorphism in buffalo milk. *Food Chemistry*, 126159.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., & Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2046-2056.

- Mao, X., Gu, J., Sun, Y., Xu, S., Zhang, X., Yang, H., & Ren, F. (2009). Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells. *International Dairy Journal*, 19(11), 703-708.
- Maqsood, S., Al-Dowaila, A., Mudgil, P., Kamal, H., Jobe, B., & Hassan, H. M. (2019). Comparative characterization of protein and lipid fractions from camel and cow milk, their functionality, antioxidant and antihypertensive properties upon simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 279, 328-338.
- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322-329.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Neta, P., Pu, Q. L., Yang, X., & Stein, S. E. (2007). Consecutive neutral losses of H₂O and C₂H₄O from N-Terminal Thr–Thr and Thr–Ser in collision-induced dissociation of protonated peptides: Position dependent water loss from single Thr or Ser. *International Journal of Mass Spectrometry*, 267(1-3), 295-301.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2015). The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. *Journal of Functional Foods*, 17, 640-656.
- Perna, A., Simonetti, A., & Gambacorta, E. (2016). Effect of casein haplotype on angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant capacities of milk casein from Italian Holstein cows before and following in vitro digestion with gastrointestinal enzymes. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 6922-6926.
- Piovesana, S., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., La Barbera, G., Samperi, R., Chiozzi, R. Z., & Laganà, A. (2015). Peptidome characterization and bioactivity analysis of donkey milk. *Journal of Proteomics*, 119, 21-29.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rodríguez, J., Martín, M. J., Ruiz, M. A., & Clares, B. (2016). Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Research International*, 83, 41-59.
- Roepstorff, P., & Fohlman, J. (1984). Nomenclature for mass spectrometry of peptides, letter to the editors. *Journal Biomed. Mass Spectrom*, 11, 601-603.
- Salami, M., Moosavi-Movahedi, A. A., Ehsani, M. R., Yousefi, R., Haertle, T., Chobert, J. M., ... & Pourtakdoost, S. (2010). Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3297-3302.
- Sahoo, N. R., Kumar, P., Bhusan, B., Bhattacharya, T. K., Dayal, S., & Sahoo, M. (2012). Lysozyme in livestock: a guide to selection for disease resistance: a review. *Journal of Animal Science Advances*, 2(4), 347-360.
- Santos, N. P., Nascimento, S. C., Silva, J. F., Pereira, E. C. G., Silva, N. H., Honda, N. K., & Santos-Magalhães, N. S. (2005). Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 15(5), 355-361.
- Smith, P. E., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85.
- Tagliazucchi, D., Shamsia, S., Helal, A., & Conte, A. (2017). Angiotensin-converting

enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by *in vitro* gastro-intestinal digestion. *International Dairy Journal*, 71, 6-16.

Tang, X., He, Z., Dai, Y., Xiong, Y. L., Xie, M., & Chen, J. (2009). Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 587–593.

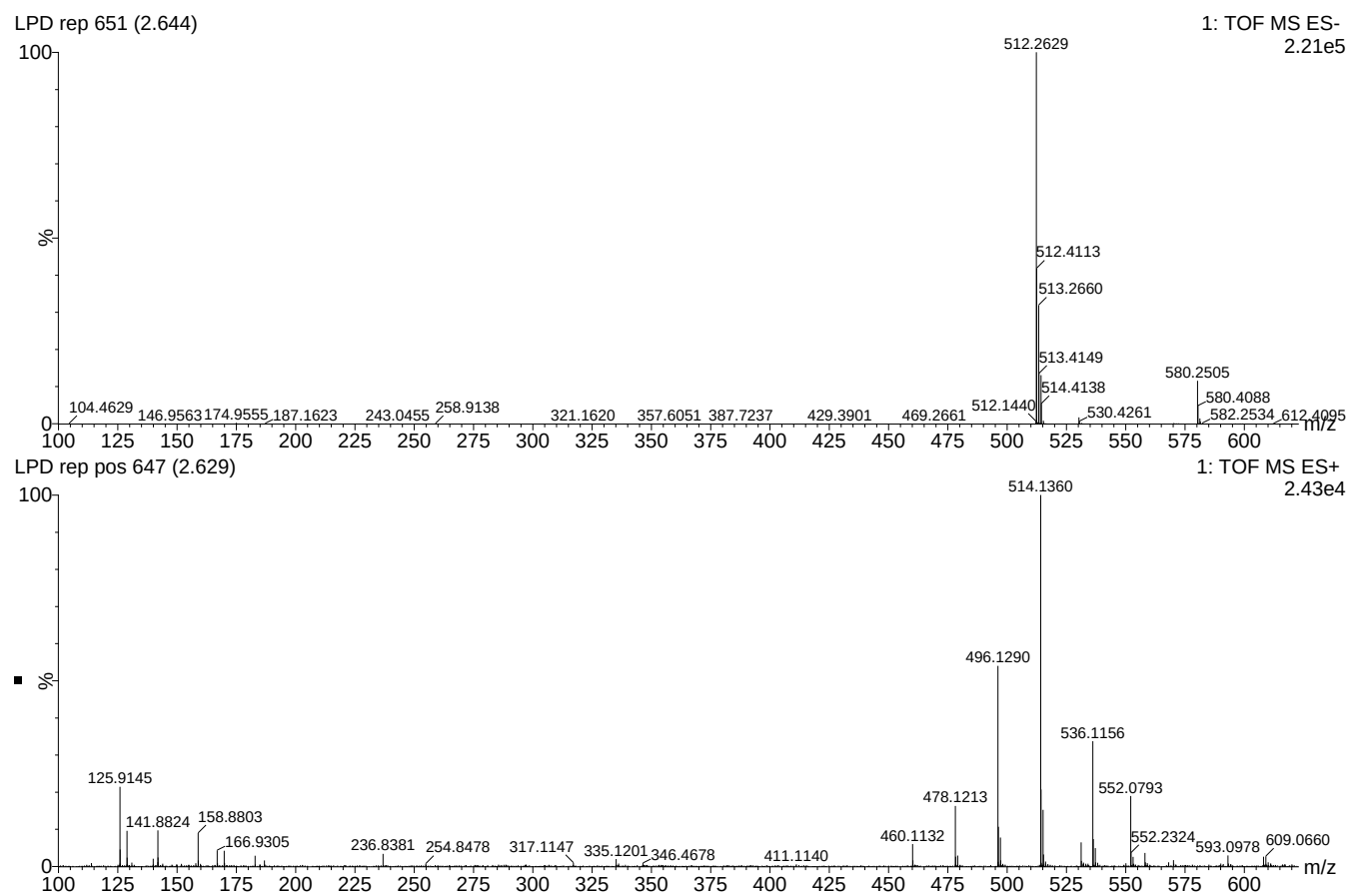
Tidona, F., Sekse, C., Criscione, A., Jacobsen, M., Bordonaro, S., Marletta, D., & Vegarud, G. E. (2011). Antimicrobial effect of donkeys' milk digested *in vitro* with human gastrointestinal enzymes. *International Dairy Journal*, 21(3), 158-165.

Thundimadathil, J. (2012). Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. *Journal of Amino Acids*, p. 1, 2012.

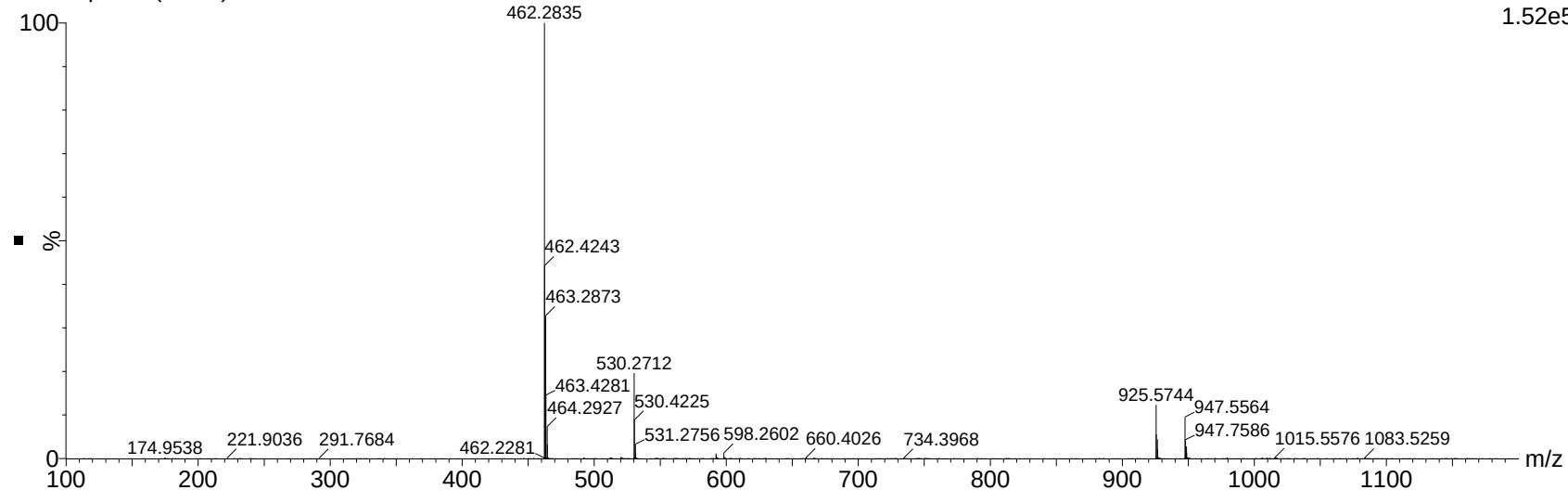
Tunick, M. H., Ren, D. X., Van Hekken, D. L., Bonnaillie, L., Paul, M., Kwoczak, R., & Tomasula, P. M. (2016). Effect of heat and homogenization on *in vitro* digestion of milk. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4124-4139.

Zubia, M., Fabre, M. S., Kerjean, V., Le Lann, K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., & Deslandes, E. (2009). Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry*, 116(3), 693-701.

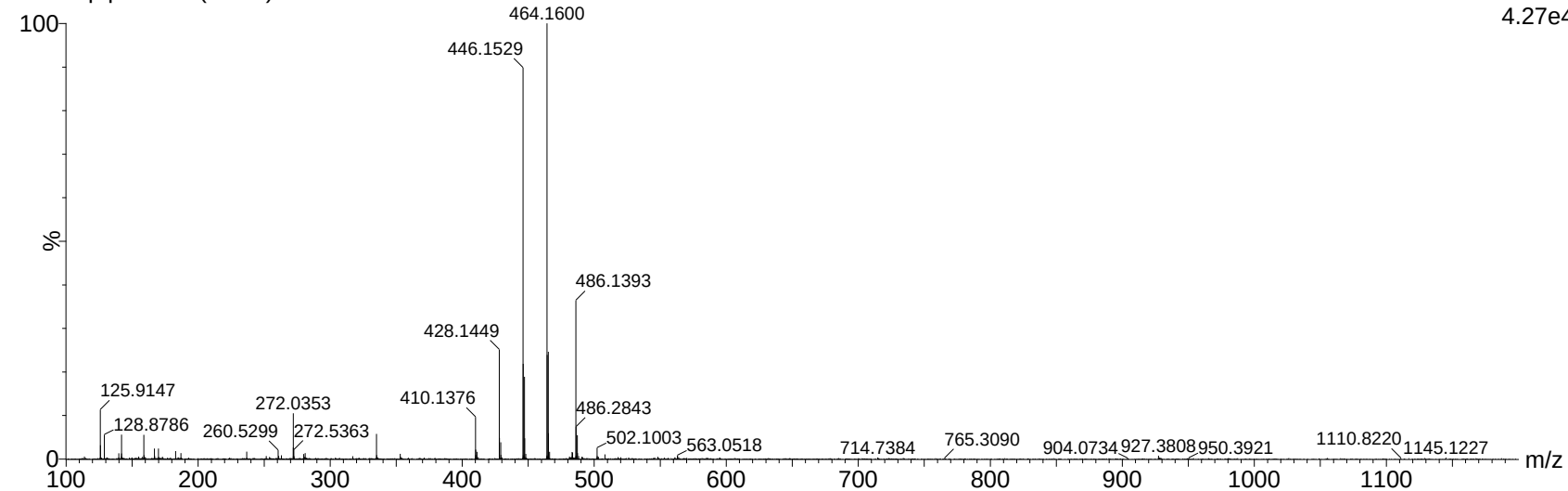
Material Suplementar I



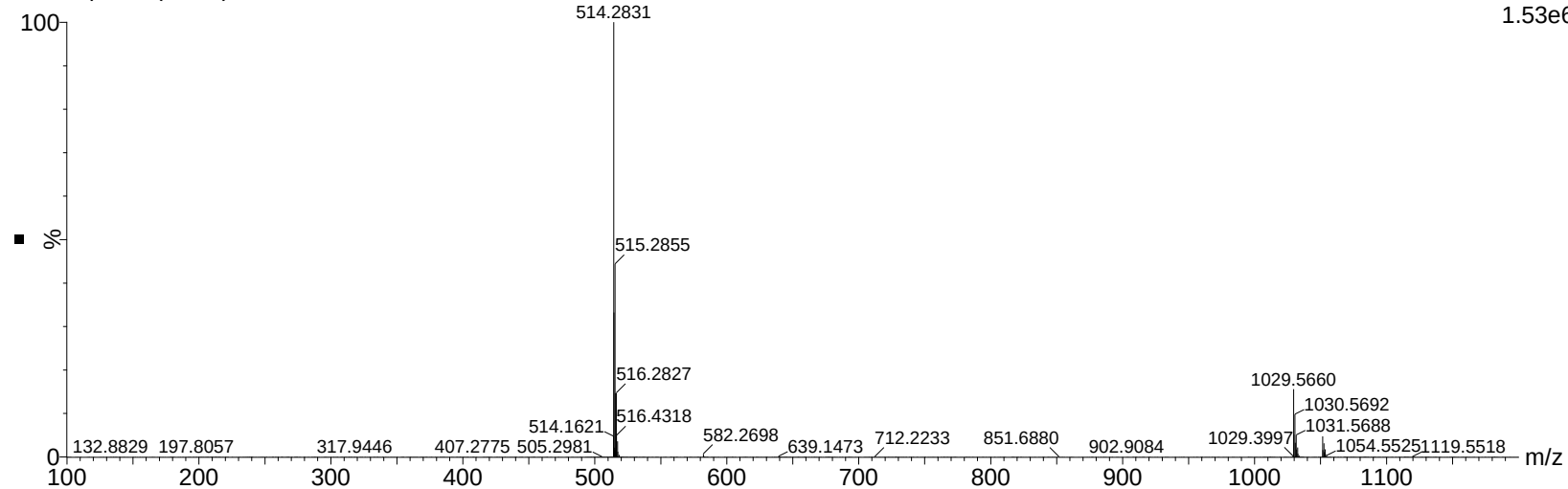
LPD rep 729 (2.960)

1: TOF MS ES-
1.52e5

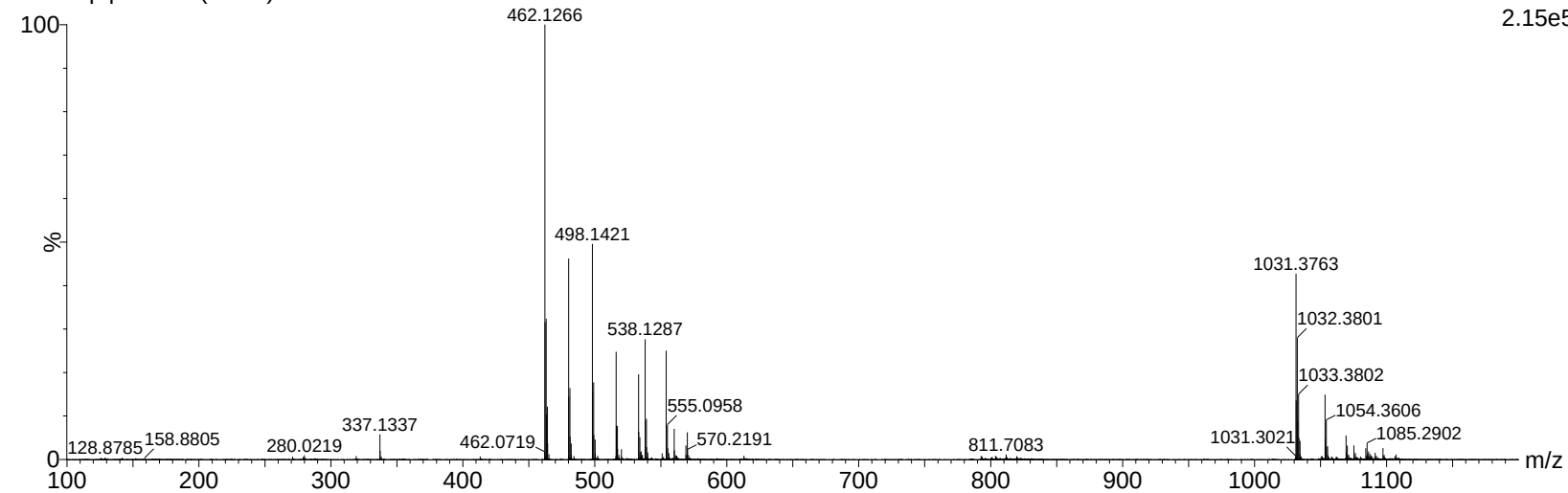
LPD rep pos 719 (2.922)

1: TOF MS ES+
4.27e4

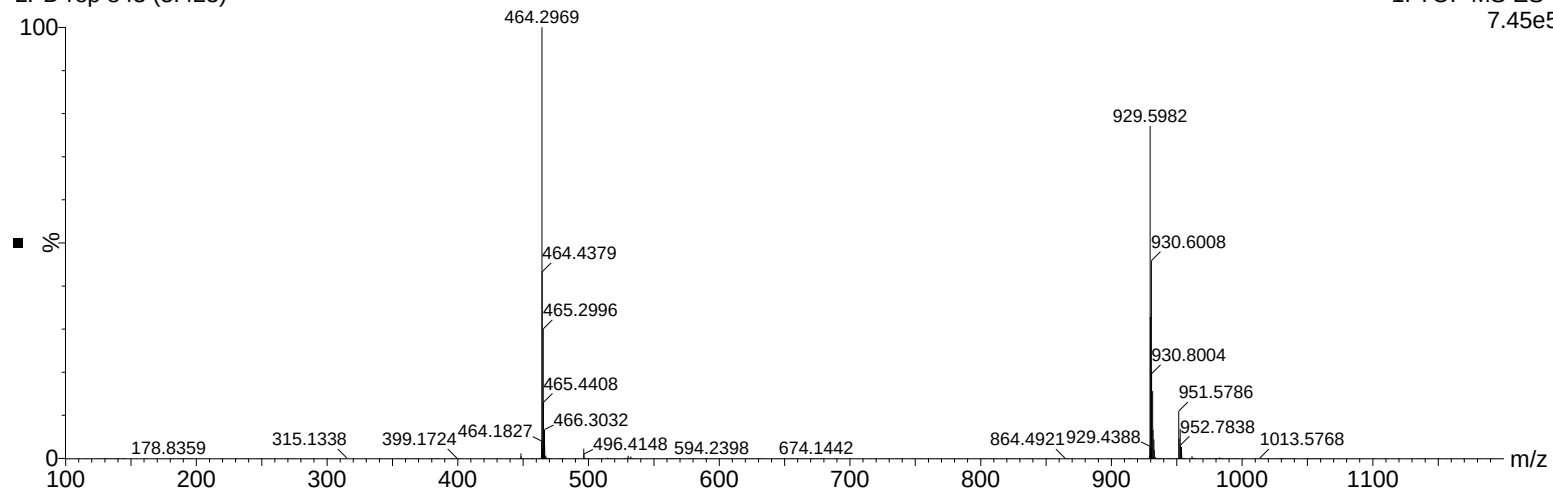
LPD rep 760 (3.088)

1: TOF MS ES-
1.53e6

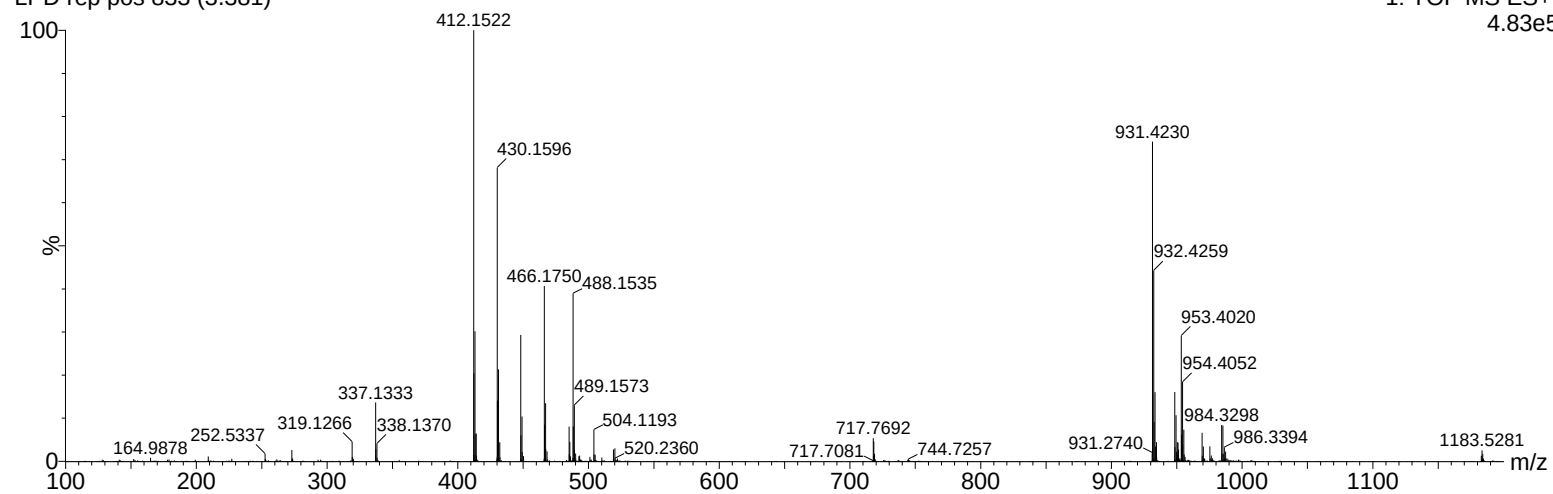
LPD rep pos 761 (3.092)

1: TOF MS ES+
2.15e5

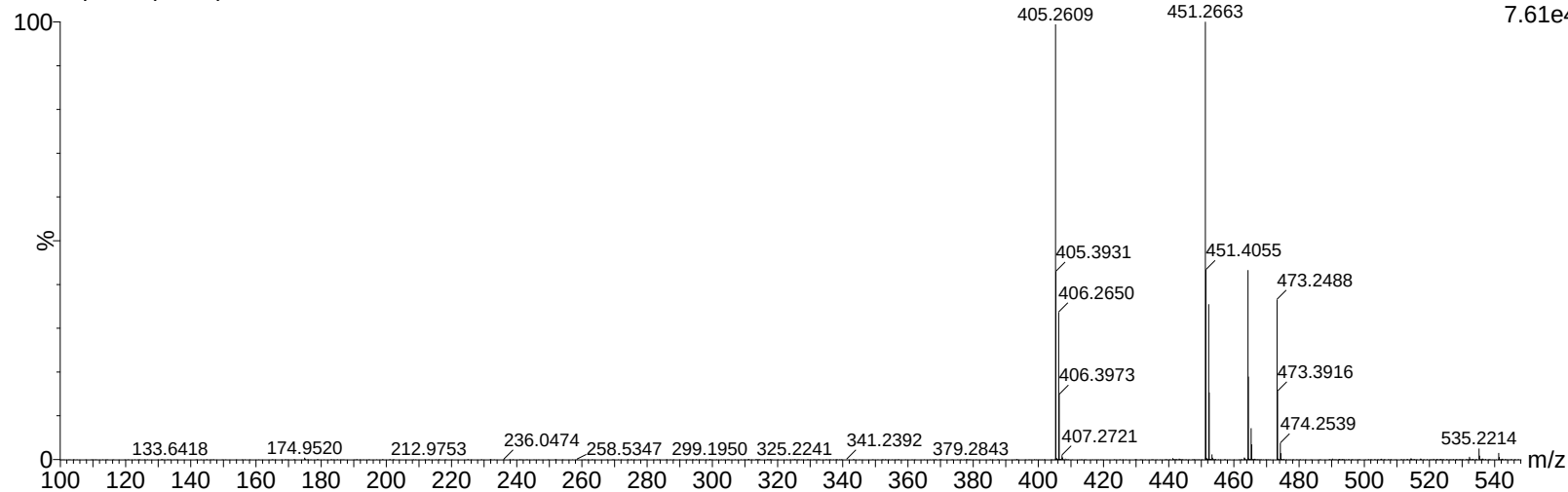
LPD rep 843 (3.423)

1: TOF MS ES-
7.45e5

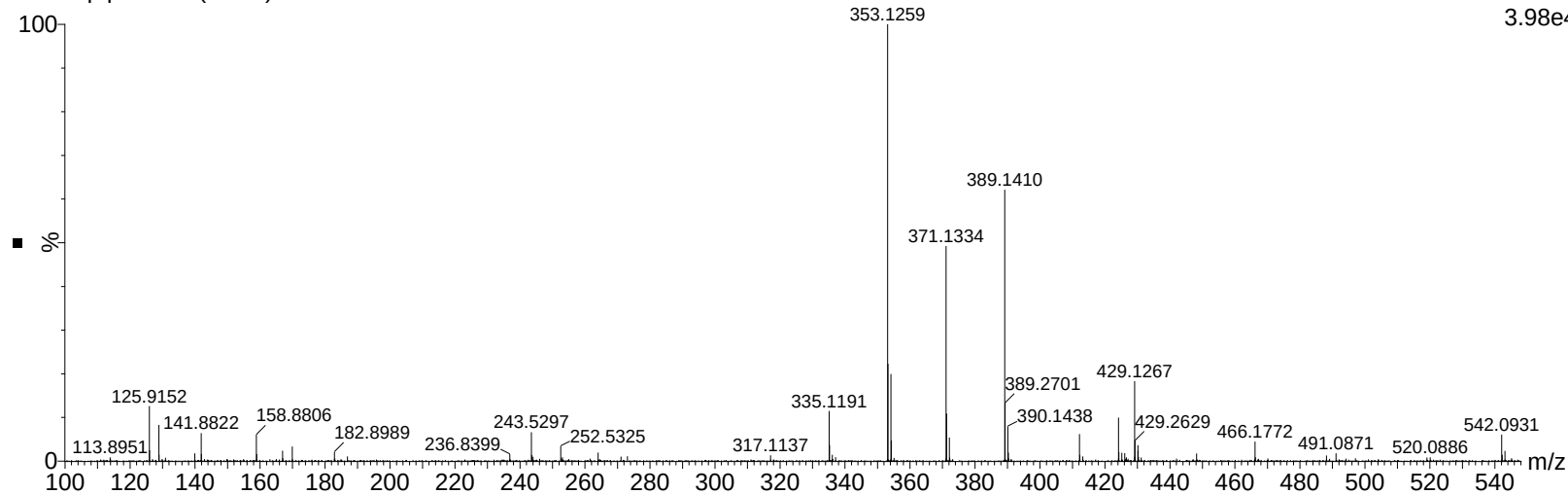
LPD rep pos 833 (3.381)

1: TOF MS ES+
4.83e5

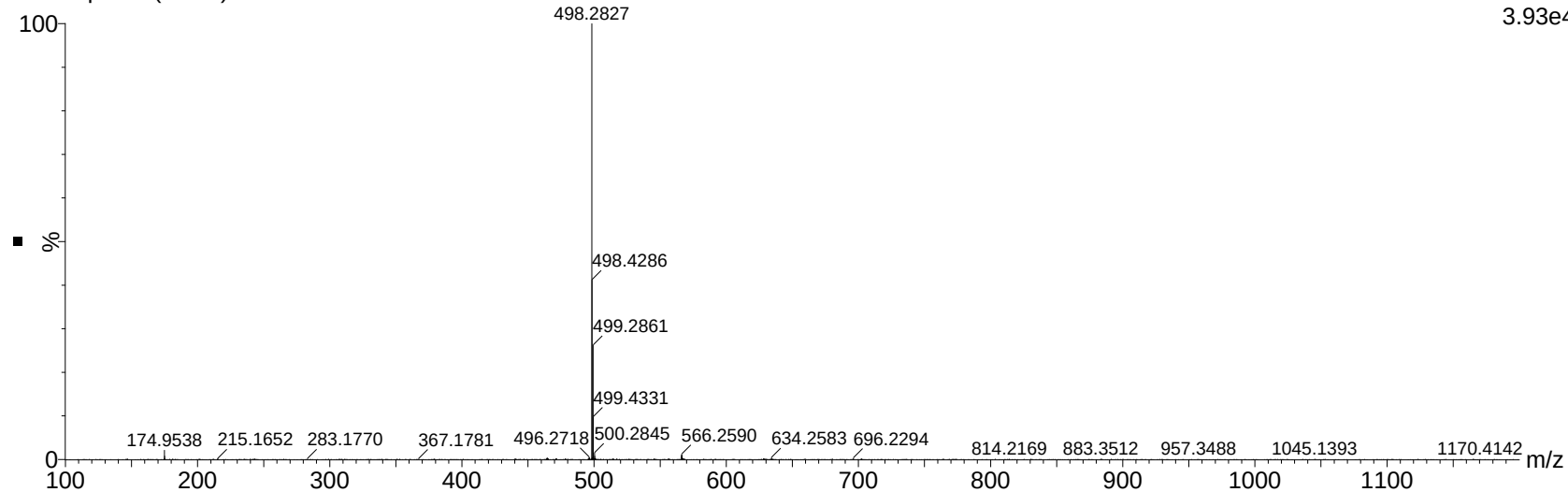
LPD rep 869 (3.527)

1: TOF MS ES-
7.61e4

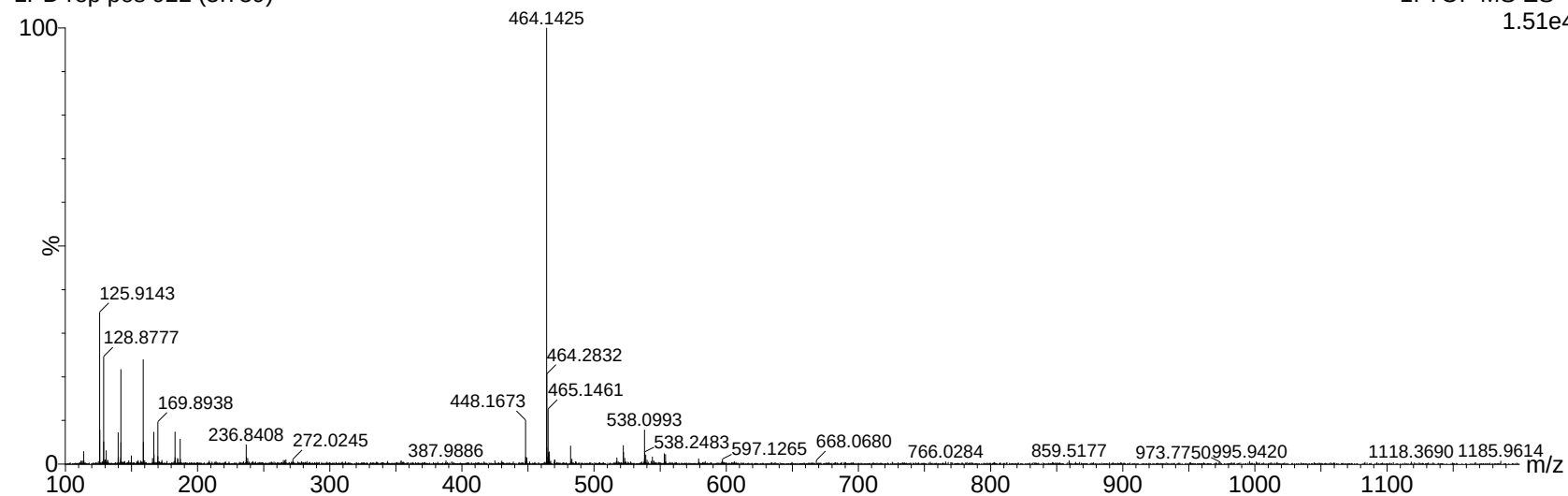
LPD rep pos 861 (3.492)

1: TOF MS ES+
3.98e4

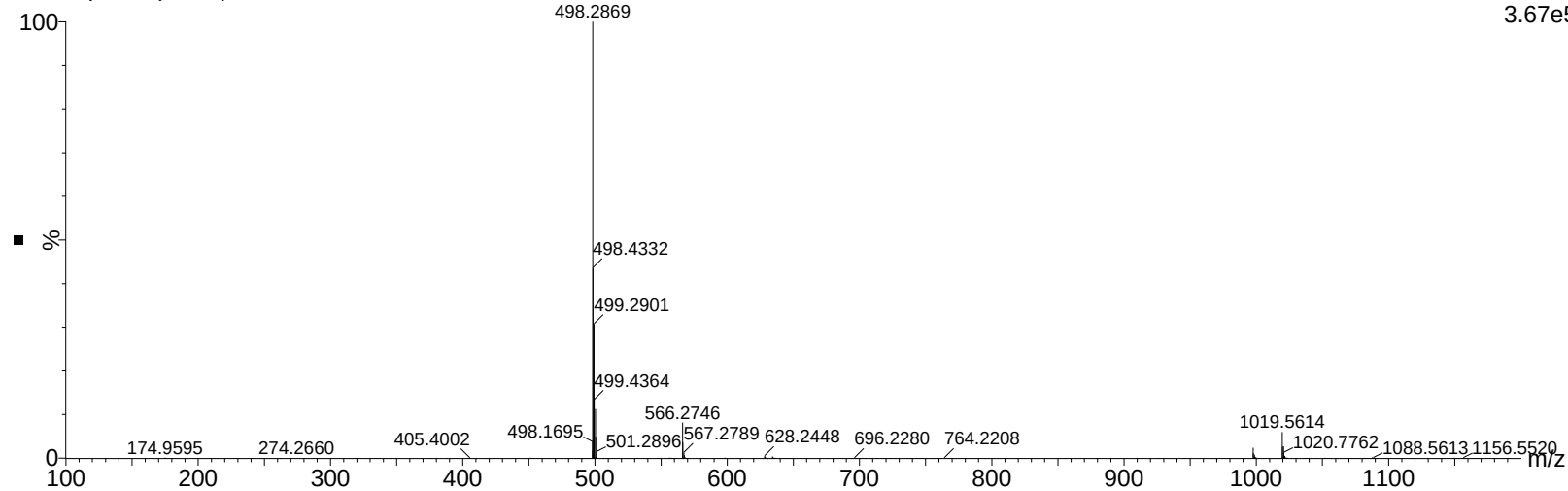
LPD rep 922 (3.738)

1: TOF MS ES-
3.93e4

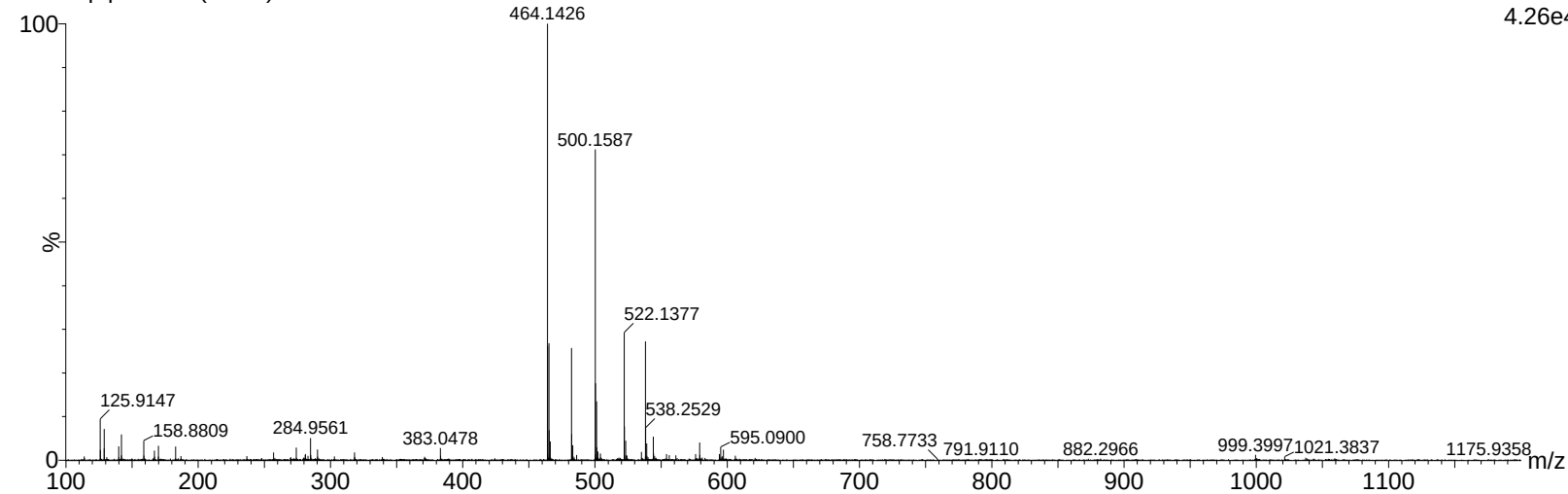
LPD rep pos 922 (3.739)

1: TOF MS ES+
1.51e4

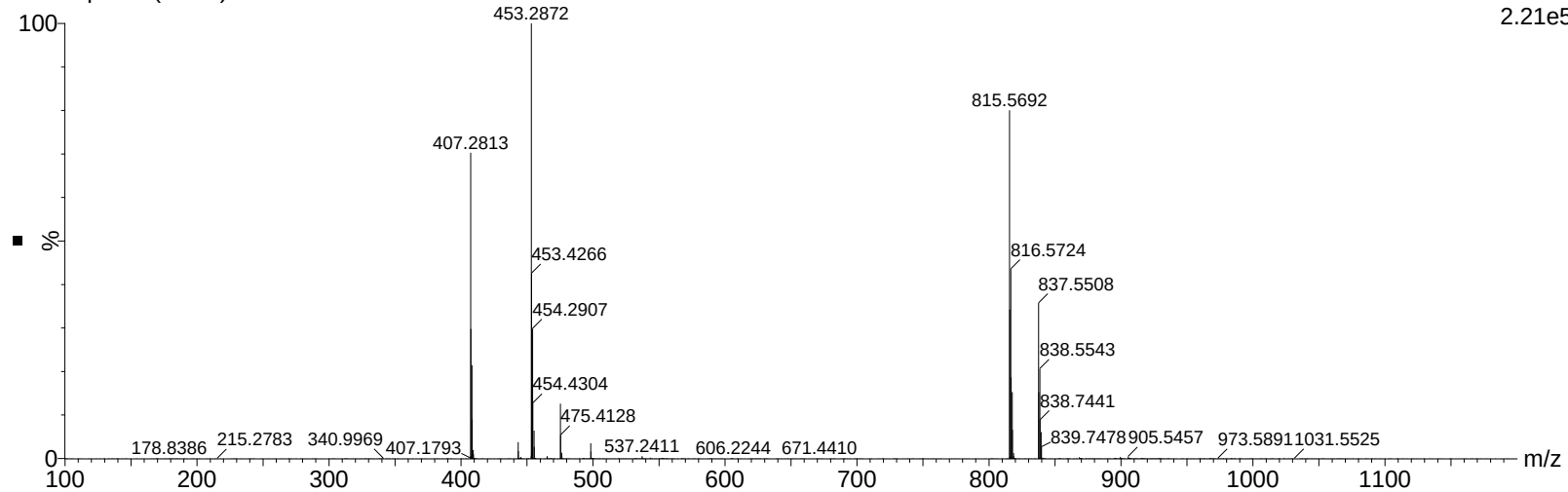
LPD rep 966 (3.916)

1: TOF MS ES-
3.67e5

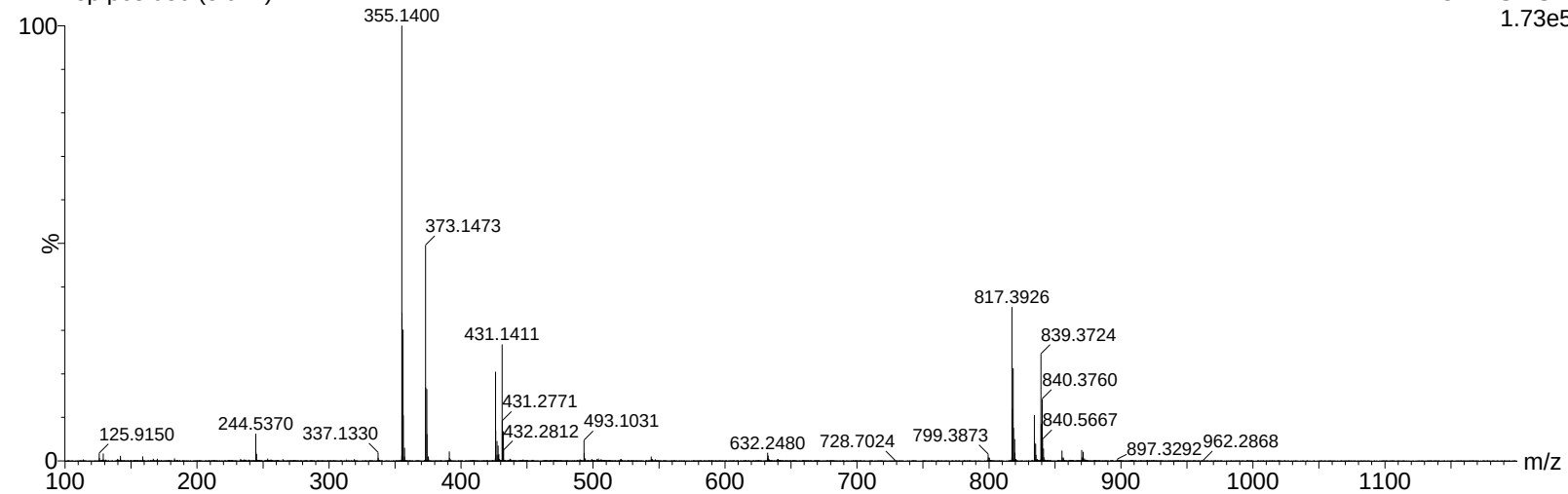
LPD rep pos 961 (3.897)

1: TOF MS ES+
4.26e4

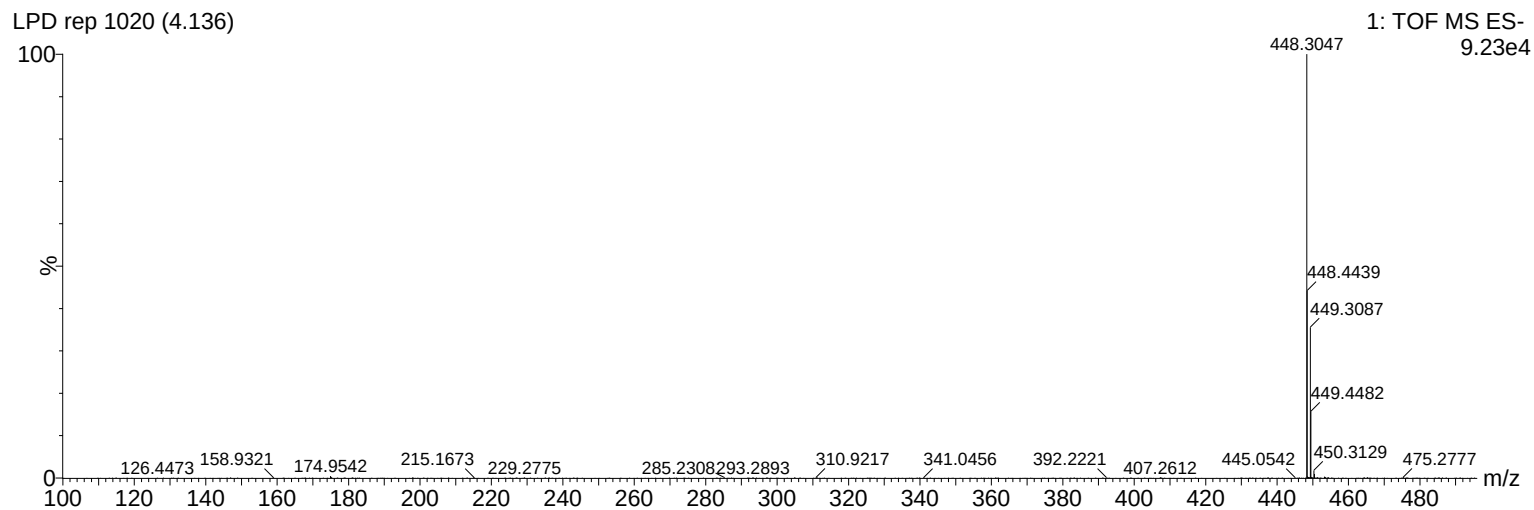
LPD rep 990 (4.017)

1: TOF MS ES-
2.21e5

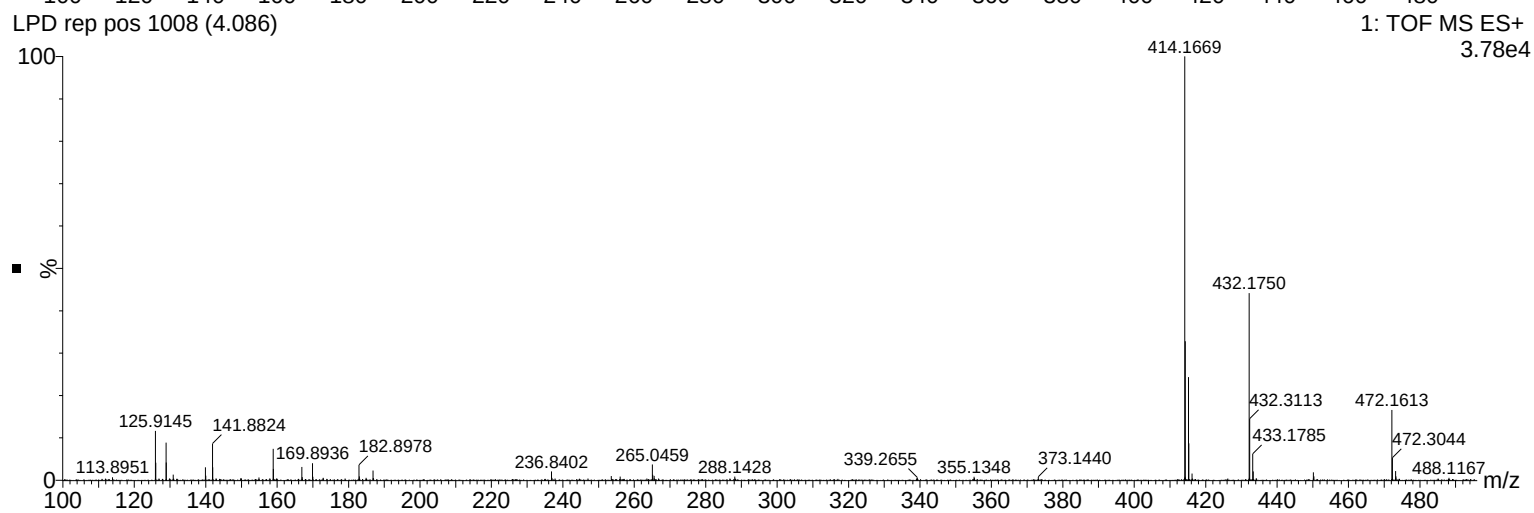
LPD rep pos 980 (3.974)

1: TOF MS ES+
1.73e5

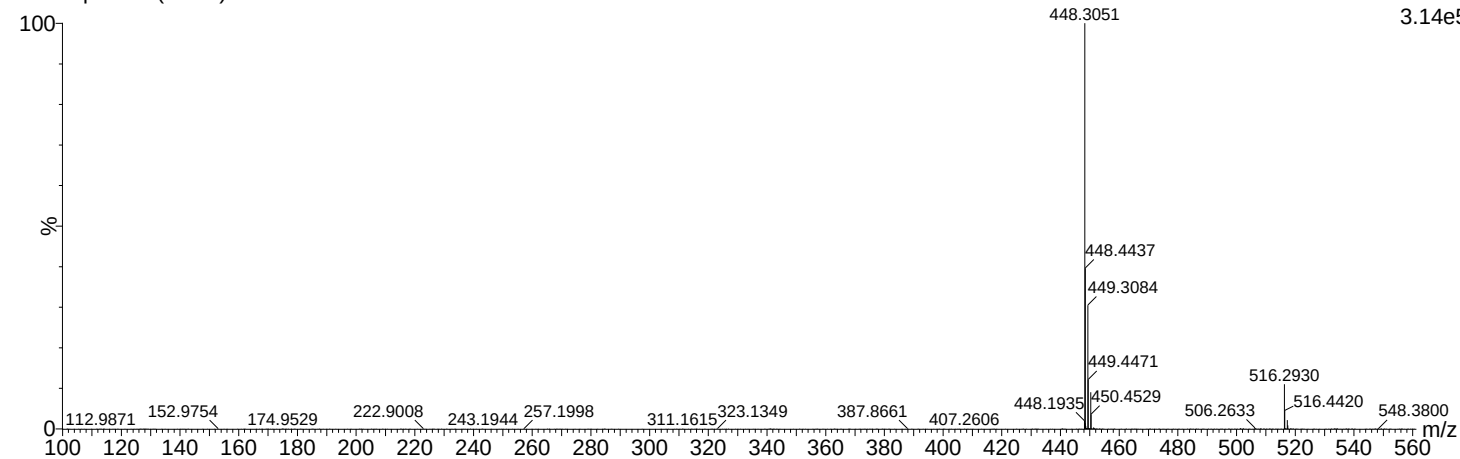
LPD rep 1020 (4.136)



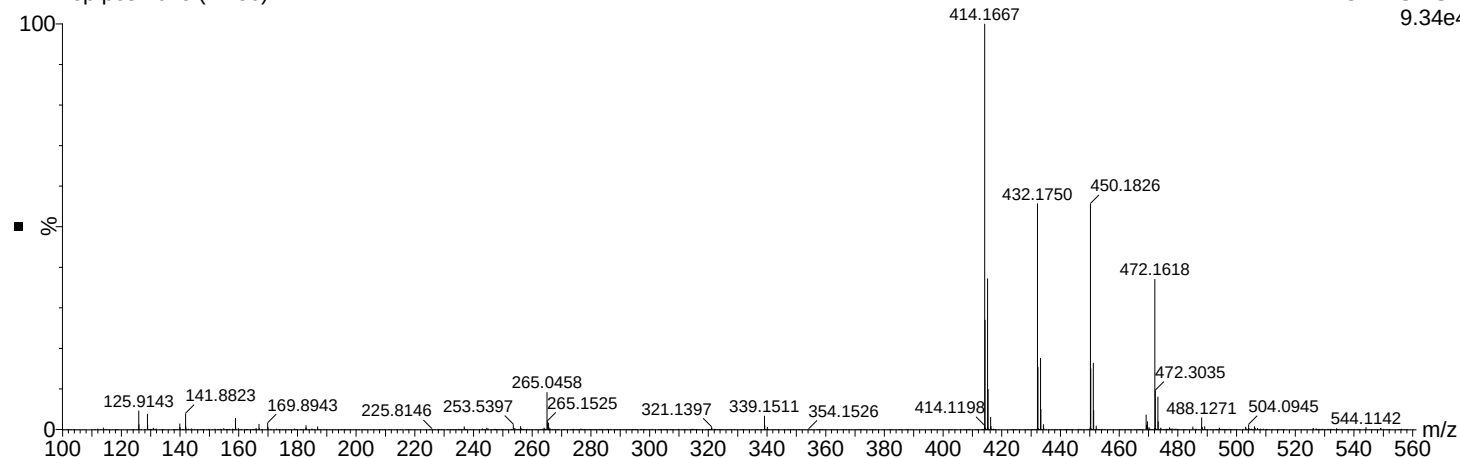
LPD rep pos 1008 (4.086)



LPD rep 1054 (4.275)

1: TOF MS ES-
3.14e5

LPD rep pos 1045 (4.236)

1: TOF MS ES+
9.34e4

CAPÍTULO III

Análise de peptídeos bioativos do leite de jumenta fermentado por
Lactobacillus rhamnosus antes e depois da digestão *in vitro*



Volume 313, 30 May 2020

ISSN: 0308-8146

FOOD CHEMISTRY

Editor-in-Chief

P. Finglas

Editor-in-Chief Emeritus

G.G. Birch

Editors

C. Alvarez

S. Astley

N. Bandara

K. Buksa

B. Cabanillas

J. Van Camp

V. Gokmen

D. Granato

F. Hidalgo

M. Holmes

K. Miyashita

D. Sun-Waterhouse

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Artigo a ser submetido à revista "FOOD CHEMISTRY"

Análise de peptídeos bioativos do leite de jumenta fermentado por
Lactobacillus rhamnosus antes e depois da digestão *in vitro*

Karoline Mirella Soares de Souza^a, Rogelio Moreno Santisteban^b, Tania Maria Sarmiento da Silva^b, Marllyn Marques da Silva^c, Mariane Cajubá Britto Lira Nogueira^c, Ana Lúcia Figueiredo Porto^a, Meire dos Santos Falcão de Lima^a, Maria Taciana Holanda Cavalcanti^a.

^a Laboratório de Tecnologia de Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s / n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

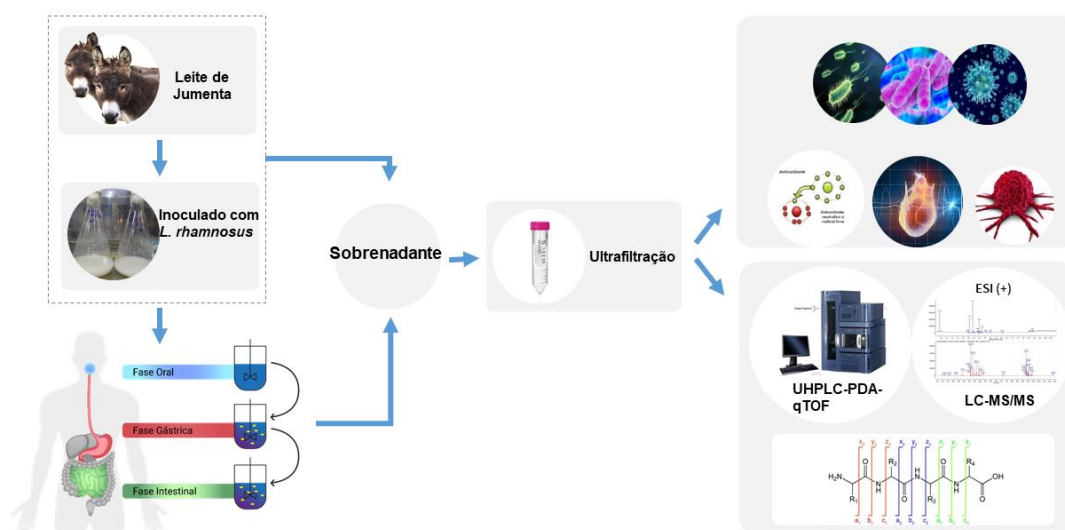
^b Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s / n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

^c Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

* Autor correspondente: Laboratório de Tecnologia de Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s / n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail: mtcvsoares@yahoo.com.br

RESUMO GRÁFICO



1. Introdução

O interesse por derivados lácteos fermentados tem crescido devido a suas propriedades nutricionais e metabólitos fisiologicamente ativos benéficos a saúde. Neste sentido, os usos de diferentes fontes lácteas são empregados: leite de Camela (Muhialdin e Algboory, 2018), leite bovino (Wu et al., 2019), leite de Jumenta (Aspri et al., 2018). A fermentação do leite, seja por processo unitário ou em combinação com cepas bacterianas com propriedades probióticas representa uma das opções tecnológicas mais econômicas e práticas para a produção de derivados lácteos enriquecidos com peptídeos bioativos (Hayes et al., 2007).

Peptídeos bioativos presentes em proteínas lácteas apresentam crescentes evidências que indicam que esses compostos podem constituir uma alternativa valiosa contra diferentes doenças. Por exemplo, estudos *in vitro* demonstraram o possível papel destes com ação antioxidante e anti-hipertensiva (Solieri, Rutella e Tagliazucchi, 2015) e antidiabetogênica (Jakubowicz e Froy, 2013), além de ação antimicrobiana (Aguilar-Toalá et al., 2017).

A liberação de diferentes peptídeos de atividade única a partir de proteínas do leite via proteólise microbiana está bem documentado (Korhonen, 2009; Li et al., 2017; Beltrán-Barrientos et al., 2018; Panchal et al., 2019), mas destaca-se à presença de peptídeos bioativos resistentes a degradação, pois apenas

peptídeos que são liberados e sobrevivem à digestão gastrointestinal podem exercer sua ação fisiológica no nível intestinal.

Alguns estudos descrevem a atividade multifuncional de peptídeos derivados de leite obtidos por fermentação microbiana seguido da digestão gastrointestinal *in vitro* (Aspri et al., 2018; Elfahri et al., 2014). Nesse sentido, peptídeos derivados do leite, tais como originados da lisozima, lactoferrina, caseína, obtidas por hidrólise enzimática utilizando pepsina e pancreatina (tripsina e quimotripsina), tenham sido relatadas (Tagliazucchi et al., 2017; Esmaeilpour et al., 2016; Espejo-carpio et al., 2016).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva e antimutagênicas de peptídeos obtidos de leite de jumenta do Nordeste brasileiro fermentados com cepas específicas de *Lactobacillus rhamnosus* antes e após digestão *in vitro*.

2. Materiais e métodos

2.1 Produtos químicos e reagentes

Todos os produtos químicos, reagentes e solventes orgânicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA). Substrato Hipuril-L-Histidil-L-leucina (HHL), Enzima conversora de angiotensina (ECA), Radical 2, 2-difenil-1- picril-hidrazil (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), 6 ácido-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich Chemie, Brazil), e meios de cultura BHI (Brain Heart Infusion) e MRS (Man, Rogosa e Sharpe) (Himedia®, Mumbai, Índia). Todos os reagentes apresentavam grau analítico.

2.2 Leite de jumenta

O leite cru de jumentas foi cedido por um criador local localizado em Vitória de Santo Antão-PE/Brasil. O material foi coletado e transportado sob condições de temperatura controlada para o Laboratório de Tecnologia de Bioativos – LABTECBIO, localizado no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – DMFA – UFRPE/SEDE. Alíquotas do leite cru foram avaliadas quanto à composição química dos conteúdos de (gordura, proteína total, caseína, lactose e sólidos totais), realizado no Laboratório PROGENE- UFRPE.

2.3 Produção do leite fermentado

A pré-culturas das cepas a bactéria ácido láctica *Lactobacillus rhamnosus* (Lb16) isolada de leite de ovelha fermentado por grãos de kefir, foram preservadas em leite desnatado reconstituídos e reativadas em caldo MRS. A cepa pertencente ao acervo de bactérias ácido lácticas do LABTECBIO/DMFA-UFRPE. Foram preparadas para atingir uma concentração bacteriana inicial de 10^8 UFC/mL. Foi adicionada 10% (v / v) da pré-cultura correspondente ao leite de jumenta estéril e a fermentação foi realizada por 36 h a 37°C em estufa bacteriológica. O crescimento bacteriano através da fermentação foi determinado pela produção de ácido láctico até atingir o pH 4.6, a contagem de microrganismos foi realizada pelo método de contagem de placas em ágar MRS após incubação a 37 °C por 48 h. O processo de fermentação foi interrompido por resfriamento do leite fermentado até 10 °C.

2.3.1 Preparo das amostras

O leite de jumenta fermentado foi submetido ao processo de centrifugação a 3500 xg por 20 min a 4 °C, removendo a camada superior de gordura, como descrito por Gallina et al. (2016), seguido de filtração através de papel Whatman no. 40. Os sobrenadantes das amostras foram armazenados a -20 °C.

2.3.2 Digestão *in vitro*

As amostras do leite fermentado (LF) foram submetidas à digestão *in vitro* de acordo com Egge et al., (2016), modelo desenvolvido pela ação COST FA1005 INFOGEST (2019) com modificações. Resumidamente, o protocolo é baseado no uso de três fluidos simuladores, saliva a pH 7 (FSS), fluido gástrico a pH 2 (FSG) e intestinal (duodenal) a pH 8 (FSI). Após a digestão, as amostras do LF e leite fermentado digerido (LFD) foram centrifugadas (1000 xg, 10 min a 4 °C) e ultrafiltradas em membranas *cut off* Amicon Ultra-15 com porosidade de 3kDa (BEZERRA et al. 2013). As digestões foram realizadas em triplicatas.

2.3.4 Determinação do teor de proteínas

A concentração de proteína foi determinada em triplicata de acordo com Smith et al. (1985) utilizando BCA Protein Assay Kit (Rockford, IL, EUA). As concentrações dos peptídeos usadas para análises biológicas foram padronizadas em 25, 12.5, 6.25 e 3.125 mg de cada amostra liofilizada por mL de água destilada. As amostras

foram preparadas em água destilada estéril, centrifugada a 8000 ×g, 4°C por 10 min, e o sobrenadante utilizado em todos os ensaios em triplicata.

2.4 Análise por UPLC-DAD-qTOF

Os experimentos analíticos de LC-MS foram realizados utilizando-se um cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas Quadupolo-Tof (Xevo G2-XS QToF, Waters, EUA) com ionização por eletrospray (ESI). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando-se uma coluna ACQUITY UPLC™ BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7µm, Waters, EUA) a 40°C. A fase móvel binária consistiu de uma solução aquosa de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O gradiente de eluição utilizado foi: 0.0-8.0 min, 10-50 % de B; 8,0-9,0 min, 50%-95% de B, com o fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5,0 µL. O monitoramento das análises foi realizado nos comprimentos de 290 e 320 nm (UPLC-DAD). O espectrômetro de massas foi operado em modo negativo e positivo de ionização (ESI⁻ e ESI⁺) no modo sensibilidade, sendo a detecção realizada no método centróide MS^E em faixa de variação 50-1200 Da. A voltagem do capilar foi ajustada em 3,0 kV para ESI, gás de dessolvatação (N₂) 800 L.h e 600 °C, taxa do fluxo de gás do cone 100 L/h, temperatura da fonte 120 °C, energia de colisão em rampa de 25-50 V. Todas as análises foram realizadas utilizando o lockspray para garantir a precisão e reprodutibilidade dos valores de massas. Leucina-encefalina (200,0 pg/mL) foi utilizado como padrão/referência para calibração. A aquisição e análise dos dados foram realizadas utilizando-se o software Waters MassLynx. O software ProteoWizard foi utilizado na análise MS/MS para tentativa de identificação dos peptídeos.

2.5 Determinação da atividade antimicrobiana

As atividades antimicrobianas dos extratos peptídicos foram estimadas pelo método de acordo com o Comitê Nacional de Padrões Laboratoriais Clínicos (NCCLS, 2003). As bactérias utilizadas foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117. Os resultados das atividades antimicrobianas foram confirmados após seu crescimento em cada poço com caldo BHI (Brain Heart Infusion). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de Microplaca (BioteK Elx808) 600 nm.

2.6 Determinação da atividade antioxidante usando o método ABTS e o método DPPH

O método antioxidante usando o radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico foi determinado pelo ensaio de descoloração, como descrito por Re et al. (1999) com algumas modificações. Resumidamente, o cátion do radical 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS^{•+}) foi produzido misturando a solução mãe ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM e mantendo a mistura no escuro por 12–16 h antes do uso. A solução foi então diluída em tampão fosfato salina pH 7.5 para atingir um valor de absorbância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm, determinada espectrofotometricamente (VWR® - UV-1600PC).

O método antioxidante usando o radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil foi estimado seguindo os métodos de Zubia et al. (2009). Foi utilizado 30 µl do extrato peptídico em 970 µl da solução radicalar. A absorbância de cada amostra a 517 nm determinada espectrofotometricamente (VWR® - UV-1600PC).

O trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametricroman-2-carboxílico) foi utilizado como padrão de referência em ambos os experimentos. Uma curva de calibração foi plotada (redução de absorbância vs concentração da solução padrão Trolox). A capacidade de eliminação ABTS e DPPH das amostras de teste foi expressa em milimol de capacidade antioxidante equivalente (TEAC) Trolox por 100 mL de amostra (mmol TEAC/100 mL).

2.7 Determinação da atividade anti-hipertensiva

A atividade inibidora da enzima de conversão da angiotensina dos extratos peptídicos foi avaliada in vitro pelo método de Cushman e Cheung (1971), com algumas modificações de acordo com Meira et al. (2012). Este método utiliza a enzima conversora de angiotensina (ECA) e o substrato Hippuryl-Histidyl-Leucine (HHL). A absorbância foi detectada a 215 nm (VWR® - UV-1600PC), e resultados de inibição expressa em IC₅₀. O captopril foi utilizado como referência na determinação da inibição da ECA.

2.8 Determinação da atividade citotóxica

As linhagens celulares J774.A1 (macrófagos), MDA-MB-231 (adenocarcinoma humano da glândula mamária) e S-180 (uma linhagem heterogênea de células

de tumor de camundongos de origem mesodérmica) foram utilizadas para avaliação da viabilidade celular (DEBNATH et al., 2017). As células J774.A1 e S-180 foram cultivadas em meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (10%) e penicilina-estreptomicina (1%) a 37 °C e 5% de CO₂; e a cultura MDA-MB-231 foi mantida em meio de cultura L-15 de Leibovitz e F-12 (proporção de 50% de cada meio) com L- glutamina 2 mM, sem bicarbonato de sódio e soro bovino fetal a uma concentração final de 10% com ausência de CO₂. As células foram contabilizadas em câmara de Neubauer para o teste de viabilidade celular. Para determinar a citotoxicidade frente aos extratos peptídicos obtidos do leite de jumenta fermentado por *L. rhamnosus*, um ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) foi utilizado segundo MOSSMAN, 1983. As células foram inoculadas em placas de 96 poços: J774 a 1x10⁵ células/mL, S-180 a 1x10⁶ células/mL e MDA a 1x10⁴ células/mL. Após 24h de crescimento celular, as células foram tratadas com os extratos peptídicos solubilizados em salina ao cultivo celular nas concentrações finais de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, durante mais 24 h de crescimento. Após esse período de tratamento, 20 µL de solução de MTT (4mg/mL) foi adicionado em cada poço, e as placas foram incubadas durante 2:30 h. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e adicionados 100 µL de DMSO (Dimethylsulfoxide). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de Microplaca (BioteK Elx808) 630 nm. A citotoxicidade foi expressa em viabilidade celular segundo Santos et al. (2005).

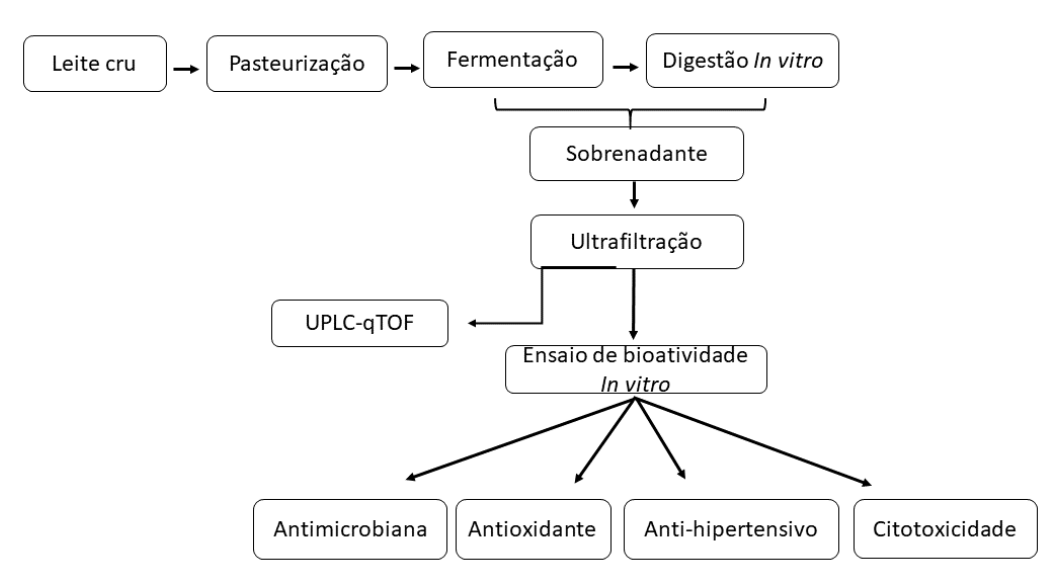
$$Citotocidade \% = \frac{Abs da população trada \times 100}{Abs da população celula nao tratada}$$

2.9 Análise estatística

Todas os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram expressos como a média ± desvio padrão (DP). A análise estatística foi feita no Programa GraphPad Prisma 8.3.0. Os dados foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) para determinar as diferenças entre as amostras. Diferenças significativas foram comparadas pelo teste de Turkey e Bonferroni no nível de P <0,05.

3. Resultado e discussão

Figura 1. Fluxograma experimental das análises com o leite de jumenta fermentado



3.1 Fermentação do leite

A cepa específica de *Lactobacillus rhamnosus* Lb16 de leite de ovelha fermentado por grãos de kefir, usadas para a fermentação do leite de jumenta demonstrou bom desempenho fermentativo. O seu desempenho fermentativo foi avaliado em intervalos regulares, com base na produção de ácido láctico como metabolito primário e o declínio ao pH 4,6, assim como o crescimento e proliferação das bactérias BAL foi avaliado pela determinação das contagens de células viáveis.

Após a inoculação as estirpes atingiram valores de pH de cerca de $4,6 \pm 0,5$ entre 30 a 37 h. A estirpe testada neste estudo foi capaz de crescer no leite sob as condições aplicadas.

Este produto lácteo foi produzido a partir de leite tratado termicamente em condições estéreis, e isolado termicamente como medida para excluir possíveis interferências causadas por microrganismos deteriorantes. A contagem de células no final da fermentação firmou-se a $3,5 \times 10^{-8}$ UFC/mL, confirmando a viabilidade da estirpe durante a fermentação.

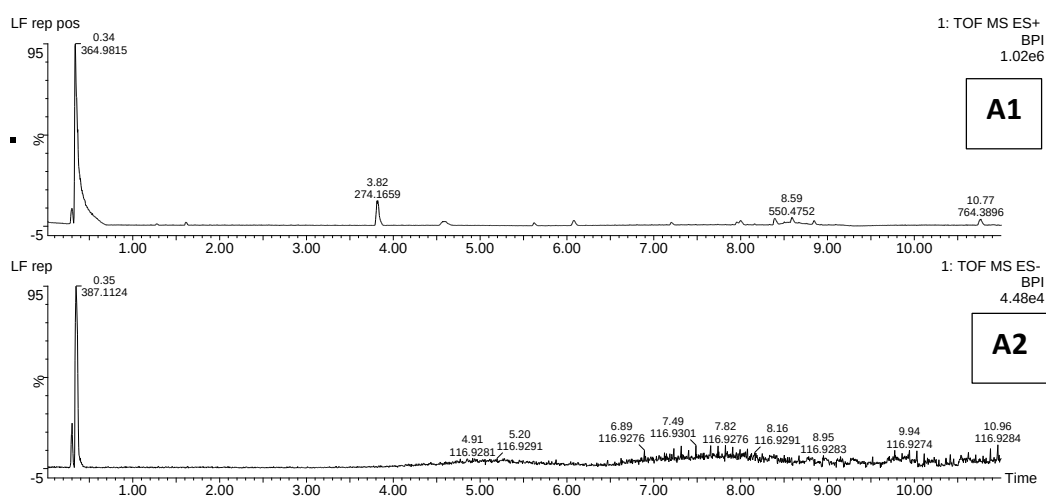
3.2 Análise por UPLC-DAD-qTOF

O método de UPLC-DAD-qTOF é conveniente para avaliar a composição

química, ele facilita a detecção de íons de fragmentação de precursores específicos, de modo que a elucidação estrutural é realizada com base nas regras de fragmentação. A análise por UPLC-DAD-qTOF da amostra LFD nos modos negativo e positivo possibilitou a identificação de 10 peptídeos.

O perfil químico das amostras LF e LFD é mostrado na Figura 2 A e B respectivamente, onde é possível observar a semelhança com o perfil química das amostras de leite pasteurizado LPD e LP (Cap. II). O leite fermentado não mostrou fragmentações, possivelmente os peptídeos tem peso acima de 1500 Da. Dos 10 compostos analisados (Tab. 1 e 2) tanto no modo negativo como no positivo, foram encontrados os pesos moleculares para cada tempo de retenção. No método LC-DAD o resultado da absorção no ultravioleta determinado, sugere que todas as substâncias propostas absorvem entre 218 e 223 nm. Todos os espectros de massas das amostras estão no material suplementar II.

Figura 2. Cromatogramas de função de baixa energia de colisão obtidos no modo MS^E com ionização por eletrospray positivo (ESI⁺) (A1 e A2) eletrospray negativo (ESI⁻) (B1 e B2) usando UPLC-qTOF das amostras LF (A) e LFD (B)



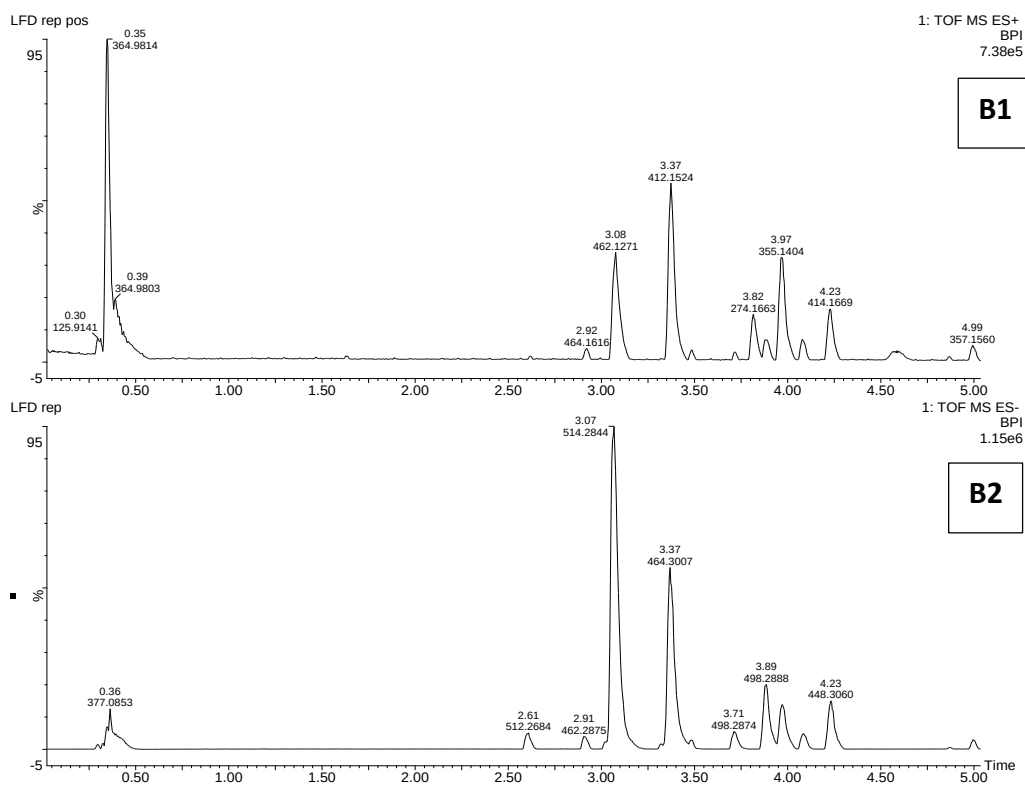


Tabela 1. Peptídeos identificados na amostra de leite de jumenta fermentado digerido (LFD) por UPLC-DAD-qTOF em modo positivo

	TR (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z) Calculado	Δm_i erro em ppm	MS/MS	Possível fragmento
1	2.62	514.2732	514.2732	0.0000	496.1280 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 478.1205 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 460.1096 [M+H-H ₂ O] ⁺	HEKT ; His-Glu-Lys-Thr-; EHKT ; Glu-His-Lys-Thr
2	2.92	464.1624	464.1623	0.2154	446.1528 [M+H-H ₂ O] ⁺ ; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 428.1448; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 410.1376	DNDT ; Asp-Asn-Asp-Thr ESDN ; Glu-Ser-Asp-Asn
3	3.08	516.2190	516.2201	-2.1308	[M+H-H ₂ O] ⁺ ; 498.1421; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 480.1344; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 462.1266	SSWH ; Ser-Ser-Trp-His
4	3.40	466.2325	466.2330	-1.0724	[M+H-H ₂ O] ⁺ ; 448.1672; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 430.1596; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 412.1522	TSKM ; Thr-Ser-Lys-Met;
5	3.50	407.1418	407.1409	2.2105	[M+H-H ₂ O] ⁺ ; 389.1409; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 371.1333; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 353.1259; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 335.1191	ESGD ; Glu-Ser-Gly-Asp SDGE ; Ser-Asp-Gly-Glu
6	3.83	500.1600	500.1632	-6.3979	[M+H-H ₂ O] ⁺ ; 482.1493; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 464.1426	DHDN ; Asp-His-Asp-Asn
7	3.90	500.1600	500.1632	-6.3979	[M+H-H ₂ O] ⁺ ; 482.1493; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 464.1426	DHDN ; Asp-His-Asp-Asn
8	4.00	409.1565	409.1565	0.0000	[M+H-H ₂ O] ⁺ ; 391.1556; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 373.1468; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 355.1396	ESSS ; Glu-Ser-Ser-Ser; SSDT ; Ser-Ser-Asp-Thr
9	4.10	450.1835	450.1831	0.8885	[M+H-H ₂ O] ⁺ ; 432.1752; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 414.1671	NEST ; Asn-Glu-Ser-Thr; SNET ; Ser-Asn-Glu-Thr; SQES ; Ser-Gln-Glu-Ser
10	4.23	450.1835	450.1831	0.8885	[M+H-H ₂ O] ⁺ ; 432.1752; [M+H-H ₂ O] ⁺ ; 414.1671	NEST ; Asn-Glu-Ser-Thr; SNET ; Ser-Asn-Glu-Thr; SQES ; Ser-Gln-Glu-Ser

Tabela 2. Peptídeos identificados na amostra de leite de jumenta fermentado digerido (LFD) por UPLC-DAD-qTOF em modo negativo

	RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z) Calculado	Possível fragmento
1	2.62	512.2664	512.2661	HEKT ; His-Glu-Lys-Thr-; EHKT ; Glu-His-Lys-Thr
2	2.92	462.2722	462.2722	DNDT ; Asp-Asn-Asp-Thr; ESDN ; Glu-Ser-Asp-A
3	3.08	514.2819	514.2817	SSWH ; Ser-Ser-Trp-His
4	3.40	464.2180	464.2184	TSKM ; Thr-Ser-Lys-Met;
5	3.52	405.2507	405.2507	ESGD ; Glu-Ser-Gly-Asp; SDGE ; Ser-Asp-Gly-Glu
6	3.73	498.2722	498.2722	DHDN ; Asp-His-Asp-Asn
7	3.92	498.2869	498.2722	DHDN ; Asp-His-Asp-Asn
8	4.00	407.1420	407.1420	ESSS ; Glu-Ser-Ser-Ser; SSDT ; Ser-Ser-Asp-Thr
9	4.10	448.1685	448.1685	NEST ; Asn-Glu-Ser-Thr; SNET ; Ser-Asn-Glu-Thr; SQES ; Ser-Gln-Glu-Ser
10	4.23	448.1685	448.1685	NEST ; Asn-Glu-Ser-Thr; SNET ; Ser-Asn-Glu-Thr; SQES ; Ser-Gln-Glu-Ser

No modo positivo foram encontrados adutos de $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ e perdas neutras de duas e três moléculas de água (H_2O) (Tabela 1). Essas perdas sucessivas de moléculas de água foram relatadas nos peptídeos Serina e Treonina de acordo com Harrison (2011) e Neta et al. (2007). Em todos os espectros analisados foram encontrados íons produtos dos aminoácidos pelas quebras da ligação peptídica *b* e *y* para determinar a sequência dos possíveis peptídeos com o software ProteoWizard.

No modo negativo íons desprotonados $[M-H]^-$ foram observados (Tabela 2), a presença de grupos com características ácidas como no caso de alguns peptídeos com presença de carboxila o que permitiu comparar com a massa do modo positivo confirmando o mesmo peptídeo para cada tempo de retenção.

Todas as séries de íons são observadas em espectros de colisão de alta energia. A abundância relativa depende da composição. Ao contrário do CID de baixa energia, os íons não perdem prontamente amônia ou água. No resultado dos espectros de baixa energia com as perdas de água quando comparado com a literatura que pode ser a presença de Serina, Treonina ou ácido carboxílico (Aspartato e Glutamato), foram encontrados esses aminoácidos na sequências peptídicas do leite de jumenta (Aspri et al., 2018).

3.3 Atividade antimicrobiana

Sabe-se que há bactérias que causam doenças transmitidas por alimentos em humanos e a utilização de peptídeos antimicrobianos pode ser usada como estratégia a indústria, aplicando-se como conservante de fonte natural sem efeitos tóxicos ao produto e/ou consumidor. Os ensaios com o leite de jumenta fermentado antes e após digestão *in vitro* frente às bactérias testadas revelaram que os peptídeos exercem potencial antimicrobiano (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos peptídeos do leite fermentado antes e após digestão *in vitro*

Amostra	Extrato mg/mL	Microrganismos		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	<i>Escherichia coli</i> ^b	<i>Listeria monocytogenes</i> ^a
LF	25	+	+	+
	12,500	+	+	+
	6,250	+	+	+
	3,125	+	+	-
LFD	25	+	+	+
	12,500	-	+	-
	6,250	-	+	-
	3,125	-	+	-

Os símbolos (+) e (-) representam a presença ou ausência de atividade antimicrobiana. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). LF (Leite fermentado) e LFD (Leite fermentado digerido).

Os extratos peptídicos do leite de jumenta fermentado antes da digestão apresentaram inibição contra todas as cepas patogênicas e concentrações utilizadas, exceto frente a *Listeria* com inibição mínima com 6,250 mg/mL. A atividade antimicrobiana das amostras fermentadas após digestão gastrointestinal *in vitro* foi dependente da concentração empregada para as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*), na qual apresentou inibição com 25 mg/mL do extrato peptídico.

Aspri et al. (2018) avaliaram o leite de jumenta fermentado por *Enterococcus faecium* antes e após a digestão. Em seus experimentos não identificaram inibição frente a *Staphylococcus aureus* utilizando o leite fermentado, assim também não obtiveram resultados contra a *E. coli* em amostras antes e após digestão *in vitro*. Em relação a bactéria *Staphylococcus aureus* os resultados do

presente estudo se sobressaem pois foi obtida a inibição utilizando todos os extratos avaliados, entretanto apresentam similaridade frente a *E. coli* após digestão.

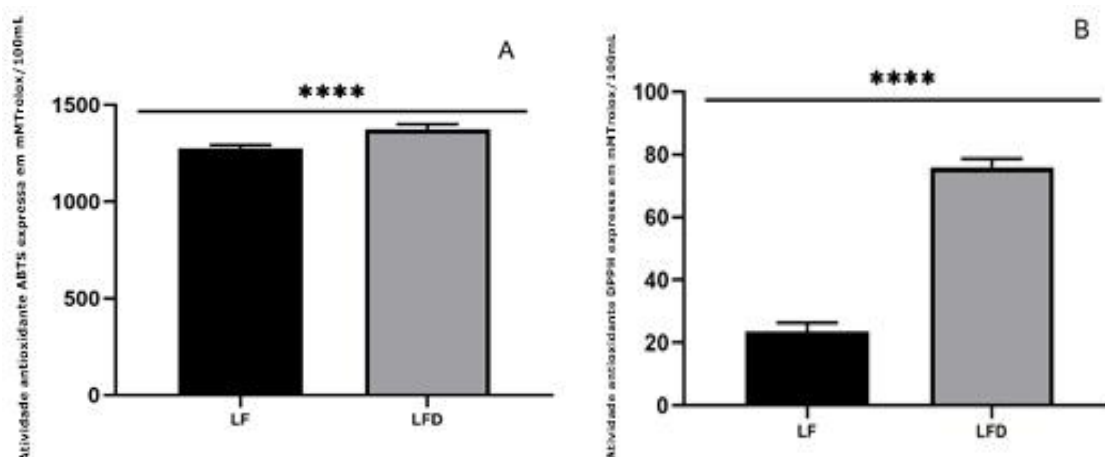
Sabe-se que o leite de jumenta possui fatores antimicrobianos protetores naturais associados parcialmente devido ao alto nível de lactoferrina e lisozima. Tidona et al. (2011) relataram que a atividade antimicrobiana do leite de jumenta digerido contra *E. coli*, *L. monocytogenes* pode ser devido a lactoferrina, tanto intacta quanto seus peptídeos produzidos pela digestão, contudo dependente da concentração. Perfil semelhante ao nosso resultado. De fato, é relatado que a interação de lactoferrina com a camada lipopolissacarídica (LPS) causa rompimento da membrana externa e aumenta a suscetibilidade de bactérias, aumentando a permeabilidade da membrana (Ellison e Giehl, 1991).

Os resultados deste estudo destacaram que o leite de jumenta fermentado por *L. rhamnosus* em ambos os estágios empregados, contém compostos antimicrobianos, incluindo peptídeos pré liberados durante a fermentação e resistentes durante o processo de digestão *in vitro*, que podem exercer efeitos benéfico a saúde, principalmente para o sistema de defesa com baixa imunidade. Além disso, apresentam uma grande vantagem de serem produzidos a partir de fonte alimentícia convencional e segura, podendo ser empregado na indústria alimentícia e farmacêutica.

3.4 Atividade Antioxidante

Neste estudo, foi utilizado como método avaliativo o ensaio de captura de radicais por ABTS e DPPH dos peptídeos do leite de jumenta fermentado, bem como as amostras após digestão gastrointestinal. Os resultados do ensaio ABTS do leite de jumenta fermentado com diferentes tratamentos são apresentados na Fig. 3A. A atividade antioxidante dos peptídeos do leite de jumenta fermentado antes e após digestão *in vitro* foi 1276,58 e 1373,77 mmol de Trolox/100 mL, respectivamente.

Figura 3. Atividade antioxidante de peptídeos do leite de jumenta fermentado antes e após digestão *in vitro* pelo método ABTS e DPPH



Atividade antioxidante por ABTS (A) e DPPH (B) expressos em mmol de Trolox/100mL. LF (Leite fermentado) e LFD (leite fermentado digerido). Diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA *P < 0,05. Cada valor determina a média $\pm$ SD de três experimentos independentes.

Após digestão, a atividade antioxidante do leite de jumenta fermentado foi elevada com 1373,77 mmol de Trolox/100 mL, indo de acordo com os achados de Aspri et al. (2018) utilizando leite de jumenta fermentado por *E. faecium* DM33 obtendo melhor ação antioxidante de 1,200 mmol de Trolox/100 mL após digestão *in vitro*.

O aumento na atividade antioxidante do leite de jumenta fermentado foi observado em todas as amostras após digestão *in vitro*, perfil de acordo com outros estudos que demonstraram que as propriedades antioxidantes das proteínas do leite poderiam ser amplificadas através da hidrólise com enzimas digestivas (Ibrahim et al. 2018). Alguns estudos relataram os efeitos antioxidantes de diferentes fontes lácteas após processo hidrolítico por fermentação e/ou digestão; leite de camela fermentado (Ayyash et al., 2017), leite de cabra hidrolisado por pepsina (Ahmed et al., 2015) ou proteína específica como a lactoferrina (Habib et al., 2013). Esse comportamento também foi observado no ensaio antioxidante por DPPH.

Os achados do ensaio DPPH com as amostras LF e LFD são apresentados na Fig. 3B. No grupo LF e LFD, apresentou atividade frente ao DPPH com 23,66 e 75,86 mmol de Trolox/100 mL) respectivamente. Conforme mostrado na Fig. 3B, o leite de jumenta fermentado digerido, exibiram atividade antioxidantes mais

baixa, conforme medido por ensaio DPPH em comparação com o ensaio ABTS, contudo, apresentando comportamento similar as amostras testadas frente ao radical ABTS, em sua maioria, apresentando melhores resultado após digestão *in vitro*.

Irshad et al. (2015) avaliaram a atividade antioxidante por DPPH utilizando peptídeos bioativos derivados de caseína bovina hidrolisada usando tripsina e pepsina. Mostraram que as frações hidrolisadas exibem melhor atividade antioxidante, indo de acordo com o nosso estudo na qual foi obtido melhores resultados por DPPH após digestão *in vitro*.

A interferência dos resultados pode ser compreendida devido a diferença e instabilidade dos métodos empregados. Apesar do uso extensivo de ensaios *in vitro* para distinguir ação antioxidantes e alimentos são mais eficazes, demonstrou-se que os ensaios apresentam limitações técnicas (Apak et al., 2013), neste caso, as limitações do método, como a influência nos mecanismos de reação do DPPH e as respostas quantitativas são alterados por diversos fatores ambientais (Schaich et al., 2015), além dos meios orgânicos que induz a precipitação proteica, diferente da utilização de meio aquoso com o referido teste por ABTS, apresentando melhor estabilidade, sendo um dos testes mais rápidos de atividade antioxidante e que oferece resultados reprodutíveis e estimar o potencial antioxidante dos compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (Barba et al., 2013), na qual apresentou melhores resultados quando comprado ao método utilizando o radical DPPH. Essas diferenças nas taxas de reação antioxidante são críticas porque refletem a capacidade dos radicais reativos de curta duração que estão presentes nos sistemas biológicos e nos alimentos (Schaich et al., 2015).

Esses extratos peptídicos apresentam elevada atividade inicialmente com o leite fermentado, assim como os peptídeos são resistentes à reação das enzimas ativas durante a digestão e/ou essas enzimas parecem liberar diferente peptídeos com atividade antioxidante que podem proteger as células do organismo pois peptídeos derivados de proteínas lácteas, possuem a capacidade de neutralizar os radicais livres por meio de doações de elétrons (Ayyash et al., 2018). Além de elevar a presença de vários resíduos de aminoácidos nas cadeias peptídicas pode melhorar as propriedades

antioxidantes (Aluko, 2012), exercendo adicionalmente uma melhor bioatividade após a digestão.

Virtanen et al. (2007) observaram melhor capacidade de eliminação do radical pelo método ABTS das frações de soro de leite fermentadas por *L. rhamnosus* ($29 \pm 0,42$ %) quando comparado a diferentes BAL: *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 ($12 \pm 0,28$), *Lactobacillus casei* H 4 $\pm 2,75$, *Lactobacillus acidophilus* F + *Bifidobacterium infantis* G ($27 \pm 10,18$).

Aguilar-Toalà (2017) avaliaram a capacidade antioxidante de frações < 3 kDa do leite fermentado por *Lactobacillus plantarum* com capacidade antioxidante entre 100 a 270 $\mu\text{mol/L}$ de Trolox/L. Em nossos estudos, utilizando o leite fermentado por *L. rhamnosus* foi obtida atividade antioxidante superior com 1276,58 moles de Trolox/100 mL.

3.5 Atividade Anti-hipertensiva

No referido estudo foram analisados os extratos peptídicos < 3 kDa do leite fermentado e digerido. O IC_{50} do leite fermentado por *L. rhamnosus* apresentou $8,23 \pm 1,23$ mg/mL, e após digestão elevou sua concentração com $9,75 \pm 0,46$ mg/mL. Provavelmente, resultados podem estar relacionados a especificidade de peptidase liberadas pela BAL, que afetam diretamente a quebra da proteína do leite em diferentes extensões (Elkhtab et al., 2017), assim sucessivamente pelo processo das enzimas digestivas, portanto, podem produzir e liberar diferentes sequencias peptídicas e aminoácidos.

Os resultados do presente estudo apresentam melhor inibição da ECA quando comparados aos estudos ao valor de IC_{50} ($273,0 \pm 27,9$ mg/mL) obtido por Bidasolo et al. (2012) utilizando leite de jumenta após digestão. Aspri et al. (2018) em seus estudos com leite de jumenta fermentado e digerido, utilizando o mesmo método de digestão do presente trabalho preconizado pela INFOGEST, obtiveram IC_{50} dependente da cepa probióticas utilizada. Além de fatores como fermentação, pH, o tipo e a concentração de BAL (Gonzalez-Gonzalez et al., 2011), e o tempo de hidrólise (Corrêa et al., 2011), pode interferir nos resultados de IC_{50} .

Recentemente, peptídeos inibidores da enzima de conversão da angiotensina foram isolados e identificados a partir do leite fermentado usando *Lactobacillus delbrueckii* QS306 (Wu et al., 2019). Indo de acordo com o perfil do presente resultado, pois o processo fermentativo seguido por hidrólise através da digestão *in vitro*, auxilia numa melhor liberação de peptídeos anti-hipertensivo de lácteos e derivados (Aspri et al., 2018).

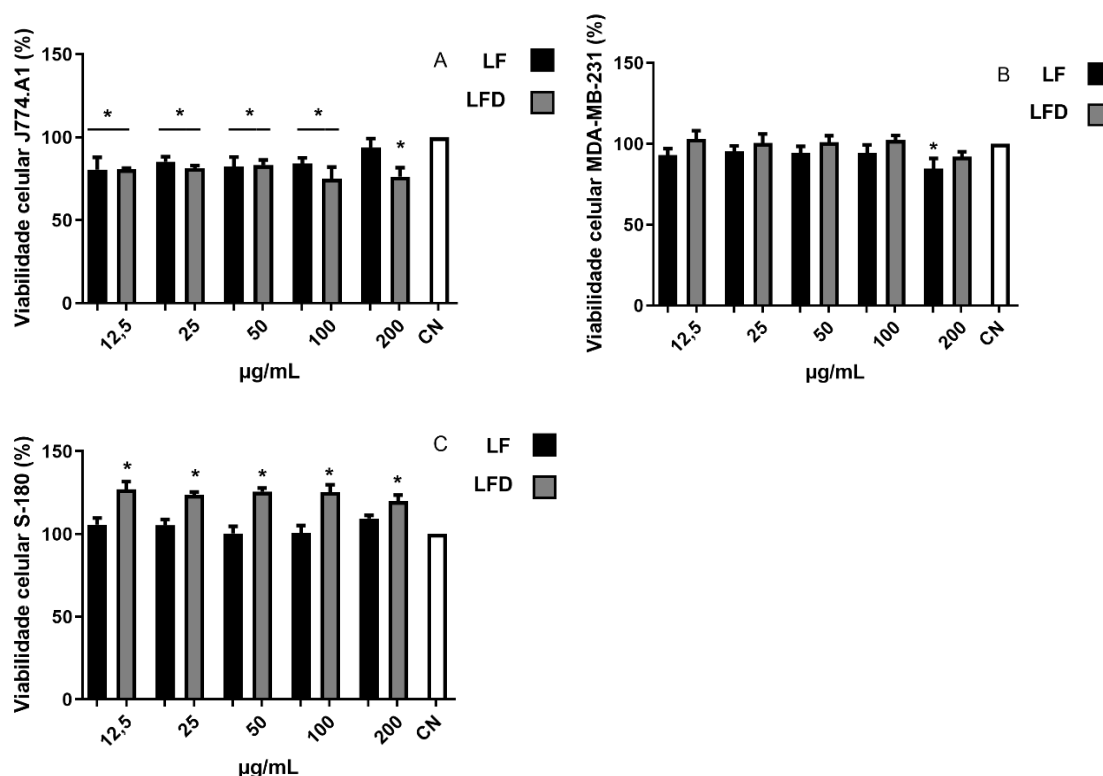
Nossos resultados indicaram que a fermentação do leite de jumenta e a digestão gastrointestinal libera peptídeos inibidores da ECA, elevando o potencial do produto como bebida funcional benéfica à saúde, pois além do leite conter sua composição nutricional básica, exerce atividades biológicas.

3.6 Ensaio de citotoxicidade

Neste trabalho, os resultados mostraram que os peptídeos foram atóxicos nas amostras LF e LFD e que a viabilidade celular estava acima de 80% nas linhagens celulares saudáveis (J774.A1) e não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo $p < 0,5$, não houve ação negativa, o que demonstra uma boa atividade sobre essa linhagem.

Mao et al. (2009) utilizando fração de proteína de soro de leite de jumenta obtido após centrifugação com massa molecular > 10 kDa mostrou exercer ação estimulante mediante a proliferação de IL-2 (interleucinas) que pode ser produzida por macrófagos, e IFN- γ (interferon) *in vitro*. Indo de acordo com nossos resultados mediante a manutenção e viabilidade celular dos macrófagos (J774.A1) testados com os peptídeos antes e após digestão *in vitro* (Fig. 4A).

Figura 4. Viabilidade celular sob influência do leite de jumenta fermentado e digerido



Viabilidade celular J774.A1 (A) macrófagos, MDA-MB-231 (B) adenocarcinoma humano da glândula mamária e S-180 (C) linhagem heterogênea de células de tumor de camundongos de origem mesodérmica com diferentes extratos peptídicos: LP (leite pasteurizado) e LPD (leite pasteurizado digerido). Diferenças estatísticas com controle foram determinadas pela ANOVA seguido de Bonferroni, *P < 0,05. Cada valor determina a média ± SD de dois experimentos independentes.

Frente as células MDA-MB-231 e S180, os compostos peptídicos não apresentaram relevância significativa frente as células cancerígenas e tumorais, respectivamente. Isso pode ser observado porque a viabilidade celular igualou-se ao controle (Fig. 4B e 4C). Sendo assim, pode-se afirmar que os peptídeos LF e LFD aqui relatadas são seguros para o uso, porém não apresentam atividade contra células cancerígenas.

Sabe-se que além de modulador intestinal, a lisozima presente no leite de jumenta poderia contribuir para sua atividade anti-inflamatória e antimicrobiana (Salimei et al., 2004; Zhang et al., 2008). Estudos proteômicos e peptídicos identificaram constituintes do leite de jumenta que possuem diferentes propriedades bioativas (CUNSOLO et al., 2017). Dentre ele, a inativação de certos vírus, atividade imuno-reguladora e antitumoral (Ibrahim e Aoki, 2003).

Em nossos resultados (Fig 4B e 4C), possivelmente, ocorreu a degradação da lisozima, inativando os compostos que pudessem exercer sua inibição frente as células cancerígenas, devido a proteólise exercida pela ação fermentativa e posteriormente enzimática por meio da digestão *in vitro*. Apesar disto, mais ensaios são necessários para elucidar em quais linhagens celulares os peptídeos do presente estudo podem atuar, dados os resultados aqui apresentados.

4. Conclusão

O leite de jumenta fermentado por *L. rhamnosus* demonstrou ser uma tática para a fabricação de um novo derivado lácteo com ação antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva e inócuo ao organismo. O perfil peptídico mostrou que a fermentação associada a simulação do processo digestivo *in vitro* mantém e/ou melhora a potencialidade dos peptídeos, tornando este produto um derivado funcional.

Referências

- Aguilar-Toalá, J. E., Santiago-López, L., Peres, C. M., Peres, C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., ... & Hernández-Mendoza, A. (2017). Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of dairy science*, 100(1), 65-75.
- Aspri, M., Leni, G., Galaverna, G., & Papademas, P. (2018). Bioactive properties of fermented donkey milk, before and after in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food chemistry*, 268, 476-484.
- Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C., & Papademas, P. (2017). Raw donkey milk as a source of *Enterococcus* diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*, 73, 81–90.
- Aguilar-Toalá, J. E., Santiago-López, L., Peres, C. M., Peres, C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., ... & Hernández-Mendoza, A. (2017). Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of dairy science*, 100(1), 65-75.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998.
- Ayyash, M., Al-Dhaheri, A. S., Al Mahadin, S., Kizhakkayil, J., & Abushelaibi, A. (2018). In vitro investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic, and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Journal of dairy science*, 101(2), 900-911.
- Ahmed, A. S., El-Bassiony, T., Elmalt, L. M., & Ibrahim, H. R. (2015). Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International*, 74, 80-88.
- Aluko, R. E. 2012. Functional Foods and Nutraceuticals. *Springer*, New York, NY, 168.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., Tedeschi, P., Brandolini, V., & Frígola, A. (2013). A comparative study of the analysis of antioxidant activities of liquid foods employing spectrophotometric, fluorometric, and chemiluminescent methods. *Food Analytical Methods*, 6(1), 317-327.
- Bezerra, V. S., Campos, J. F., Silva, R. A. D., Porto, T. S., Lima Filho, J. L. D., & Porto, A. L. F. (2013). Biotechnological richness of the northeastern semi-arid region: antioxidant activity of casein hydrolysates from Moxotó goat milk (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) obtained by papain action. *Food Science and Technology*, 33(3), 513-520.
- Beltrán-Barrientos, L. M., Estrada-Montoya, C., Reyes-Díaz, R., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Córdova, B. (2018). Does gamma-aminobutyric acid have a potential role on the antihypertensive effect of fermented

milk with *Lactococcus lactis* NRRL B-50571?. *Journal of Functional Foods*, 48, 297-301.

Coppola, R., Salimei, E., Succi, M., Sorrentino, E., Nanni, M., Ranieri, P., ... & Grazia, L. (2002). Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass's milk. *Annals of Microbiology*, 52(1), 55-60.

Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Coelho, J., Meira, S. M., Lopes, F. C., Segalin, J., ... & Brandelli, A. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2247-2254.

Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical pharmacology*, 20(7), 1637-1648.

Cunsolo, V., Saletti, R., Muccilli, V., Gallina, S., Di Francesco, A., & Foti, S. (2017). Proteins and bioactive peptides from donkey milk: The molecular basis for its reduced allergenic properties. *Food Research International*, 99, 41-57.

Debnath, S., Karan, S., Debnath, M., Dash, J., & Chatterjee, T. K. (2017). Poly-l-lysine inhibits tumor angiogenesis and induces apoptosis in ehrlich ascites carcinoma and in sarcoma S-180 tumor. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 18(8), 2255.

Esmailpour, M., Ehsani, M. R., Aminlari, M., Shekarfroush, S., & Hoseini, E. (2016). Antimicrobial activity of peptides derived from enzymatic hydrolysis of goat milk caseins. *Comparative Clinical Pathology*, 25(3), 599-605.

Espejo-Carpio, F. J., García-Moreno, P. J., Pérez-Gálvez, R., Morales-Medina, R., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2016). Effect of digestive enzymes on the bioactive properties of goat milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 54, 21-28.

Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., ... & Comi, I. (2016). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, 88, 217-225.

Elkhtab, E., El-Alfy, M., Shenana, M., Mohamed, A., & Yousef, A. E. (2017). New potentially antihypertensive peptides liberated in milk during fermentation with selected lactic acid bacteria and kombucha cultures. *Journal of dairy science*, 100(12), 9508-9520.

Ellison, R. 3., & Giehl, T. J. (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *The Journal of clinical investigation*, 88(4), 1080-1091.

Gonzalez-Gonzalez, C. R., Tuohy, K. M., & Jauregi, P. (2011). Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International dairy journal*, 21(9), 615-622.

Gallina, S., Cunsolo, V., Saletti, R., Muccilli, V., Di Francesco, A., Foti, S., ... & Roepstorff, P. (2016). Sequence characterization and glycosylation sites identification of donkey milk lactoferrin by multiple enzyme digestions and mass spectrometry. *Amino acids*, 48(7), 1569-1580.

Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2007). Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2(4), 435-449.

Habib, H. M., Ibrahim, W. H., Schneider-Stock, R., & Hassan, H. M. (2013). Camel milk lactoferrin reduces the proliferation of colorectal cancer cells and exerts antioxidant and DNA damage inhibitory activities. *Food Chemistry*, 141(1), 148-152.

Harrison, A. G. (2011). Pathways for water loss from doubly protonated peptides containing serine or threonine. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 23(1), 116-123.

Ibrahim, H. R., & Aoki, T. (2003). New promises of lysozyme as immune modulator and antimicrobial agent for nutraceuticals. *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*, 208, 361-374.

Ibrahim, H. R., Isono, H., & Miyata, T. (2018). Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins. *Animal nutrition*, 4(3), 273-280.

Irshad, I., Kanekanian, A., Peters, A., & Masud, T. (2015). Antioxidant activity of bioactive peptides derived from bovine casein hydrolysate fractions. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 231-239.

Jakubowicz, D., & Froy, O. (2013). Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat obesity and Type 2 diabetes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(1), 1-5.

Johnson, R. S., Martin, S. A., Biemann, K., Stults, J. T., & Watson, J. T. (1987). Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Analytical chemistry*, 59(21), 2621-2625.

Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of functional foods*, 1(2), 177-187.

Li, C., Kwok, L. Y., Mi, Z., Bala, J., Xue, J., Yang, J., ... & Chen, Y. (2017). Characterization of the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of fermented milks produced with *Lactobacillus casei*. *Journal of dairy science*, 100(12), 9495-9507.

Mao, X., Gu, J., Sun, Y., Xu, S., Zhang, X., Yang, H., & Ren, F. (2009). Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells. *International Dairy Journal*, 19(11), 703-708.

Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322-329.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

Muhialdin, B. J., & Algboory, H. L. (2018). Identification of low molecular weight antimicrobial peptides from Iraqi camel milk fermented with *Lactobacillus plantarum*. *PharmaNutrition*, 6(2), 69-73.

Neta, P., Pu, Q. L., Yang, X., & Stein, S. E. (2007). Consecutive neutral losses of H₂O and C₂H₄O from N-Terminal Thr–Thr and Thr–Ser in collision-induced dissociation of protonated peptides: Position dependent water loss from single Thr or Ser. *International Journal of Mass Spectrometry*, 267(1-3), 295-301

Panchal, G., Hati, S., & Sakure, A. (2020). Characterization and production of novel antioxidative peptides derived from fermented goat milk by *L. fermentum*. *LWT*, 119, 108887.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Roepstorff, P., & Fohlman, J. (1984). Nomenclature for mass spectrometry of peptides, letter to the editors. *Journal Biomed. Mass Spectrom*, 11, 601-603.

Santos, N. P., Nascimento, S. C., Silva, J. F., Pereira, E. C. G., Silva, N. H., Honda, N. K., & Santos-Magalhães, N. S. (2005). Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *Journal of drug delivery science and technology*, 15(5), 355-361.

Sahoo, N. R., Kumar, P., Bhusan, B., Bhattacharya, T. K., Dayal, S., & Sahoo, M. (2012). Lysozyme in livestock: a guide to selection for disease resistance: a review. *J. Anim. Sci. Adv*, 2(4), 347-360.

Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14, 111-125.

Smith, P. E., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.

Solieri, L., Rutella, G. S., & Tagliazucchi, D. (2015). Impact of non-starter lactobacilli on release of peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities during bovine milk fermentation. *Food microbiology*, 51, 108-116.

Tagliazucchi, D., Shamsia, S., Helal, A., & Conte, A. (2017). Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by in vitro gastro-intestinal digestion. *International Dairy Journal*, 71, 6-16.

Tidona F, Sekse C, Criscione A, Jacobsen M, Bordonaro S, Marletta D, Vegarud GE (2011b) Antimicrobial effect of donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. *Int Dairy J* 21:158–165.

Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology*, 102(1), 106-115.

Wu, N., Xu, W., Liu, K., & Xia, Y. (2019). Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Lactobacillus delbrueckii* QS306 fermented milk. *Journal of dairy science*, 102(7), 5913-5921.

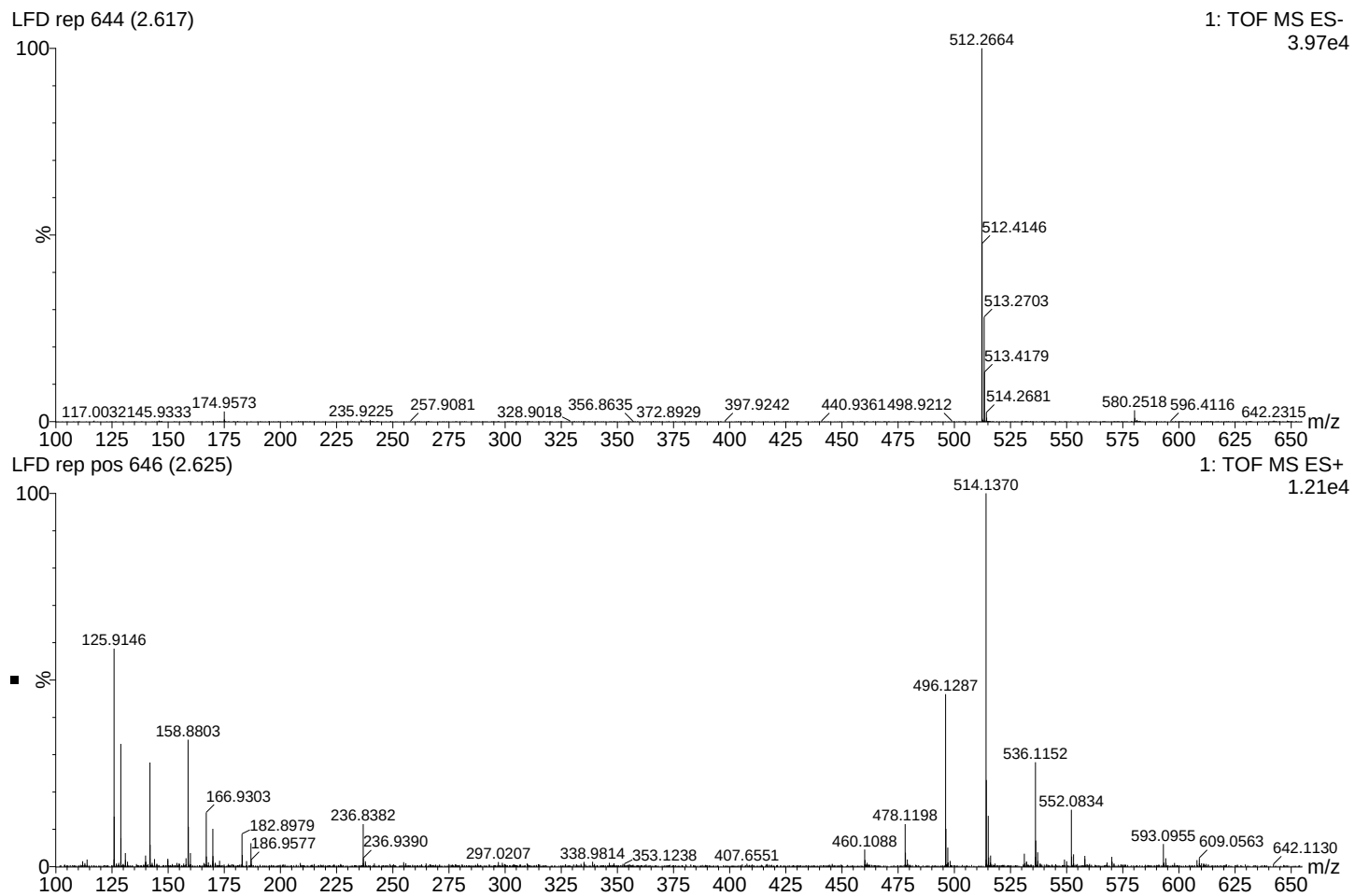
Zhang, X. Y., Zhao, L., Jiang, L., Dong, M. L., & Ren, F. Z. (2008). The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. *Food Control*, 19(12), 1191-1195.

Zubia, M., Fabre, M. S., Kerjean, V., Le Lann, K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., & Deslandes, E. (2009). Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry*, 116(3), 693-701.

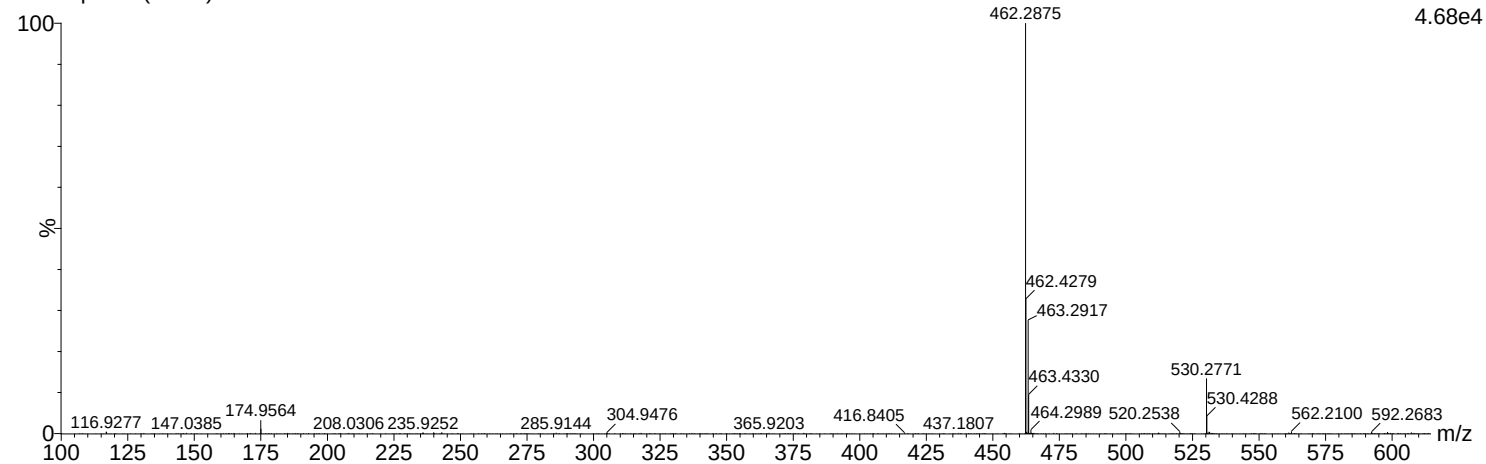
CONSIDERAÇÕES FINAIS

No referido estudo foi possível obter uma visão ampla em relação as propriedades biológicas do leite de jumenta pasteurizado e fermentado submetido a digestão *in vitro*. Constatamos que independente do processo fermentativo, o leite de jumenta apresenta bioatividade frente a microrganismos patogênicos, com inibição antes e após digestão, contudo, dependente da concentração peptídica utilizada. Para o ensaio antioxidante, as amostras mantiveram o padrão antioxidante, com melhores resultados utilizando o leite fermentado após digestão por ambos os métodos usados. Em relação a atividade anti-hipertensiva, houve pouca variação com as diferentes amostras, demonstrando inibição contra a ECA em ambos os processos de obtenção. Sua segurança foi constata após avaliação citotóxica, apresentando-se como um composto seguro no leite pasteurizado e fermentado, entretanto apresentando ação anticâncer em seu estado pasteurizado. Esses resultados indicam que o leite de jumenta podem ser fonte de peptídeos bioativos com propriedades antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensivo, inócuo e com atividade frente a células tumorais, agregando valor ao produto, por ser um alimento que pode atuar como promotor da boa saúde podendo ser utilizado para indústria alimentícia e farmacêutica.

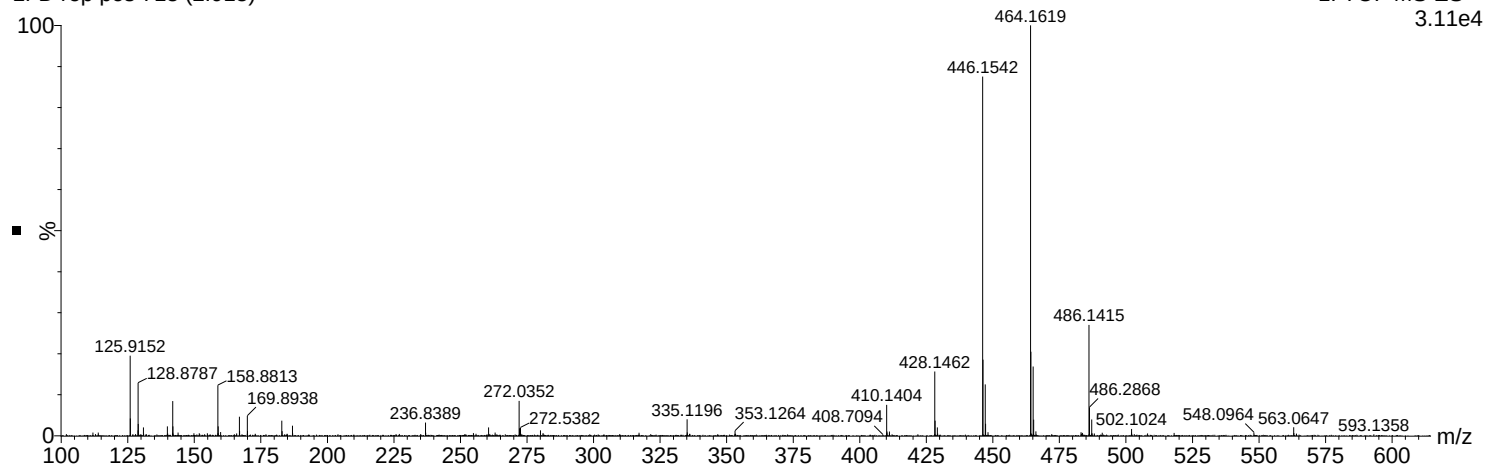
Material Supplementar II

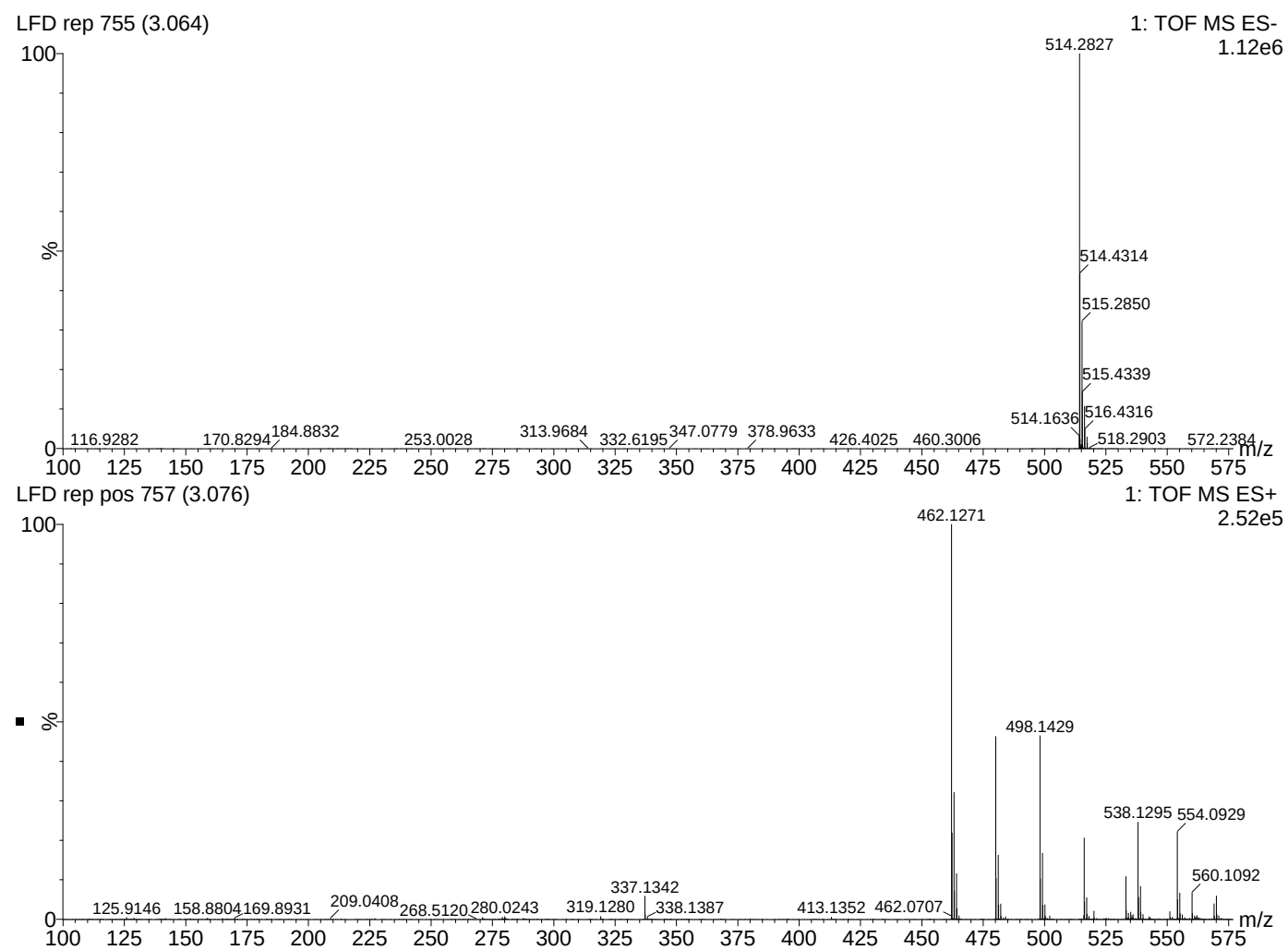


LFD rep 715 (2.907)

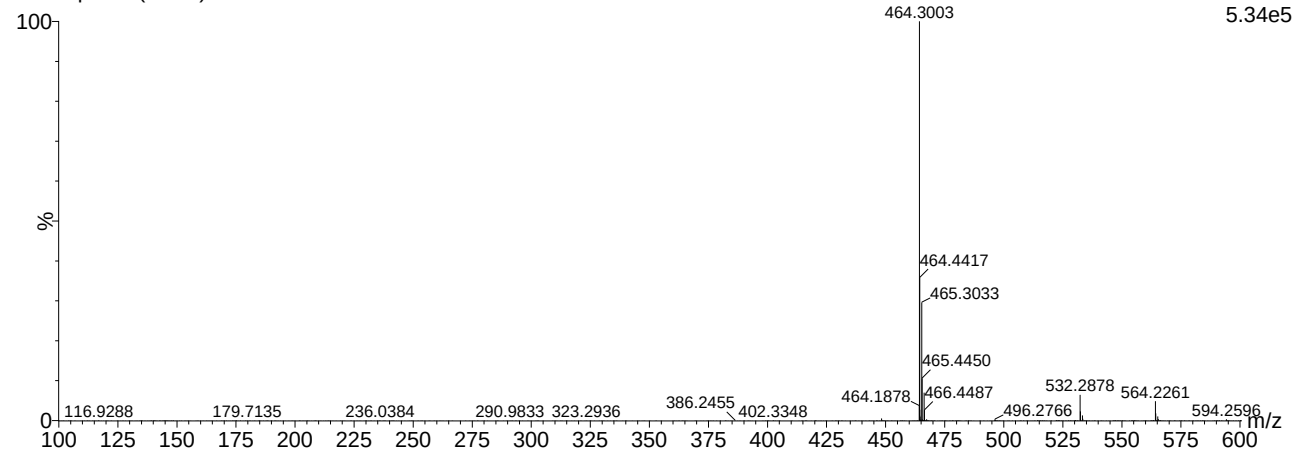


LFD rep pos 718 (2.918)

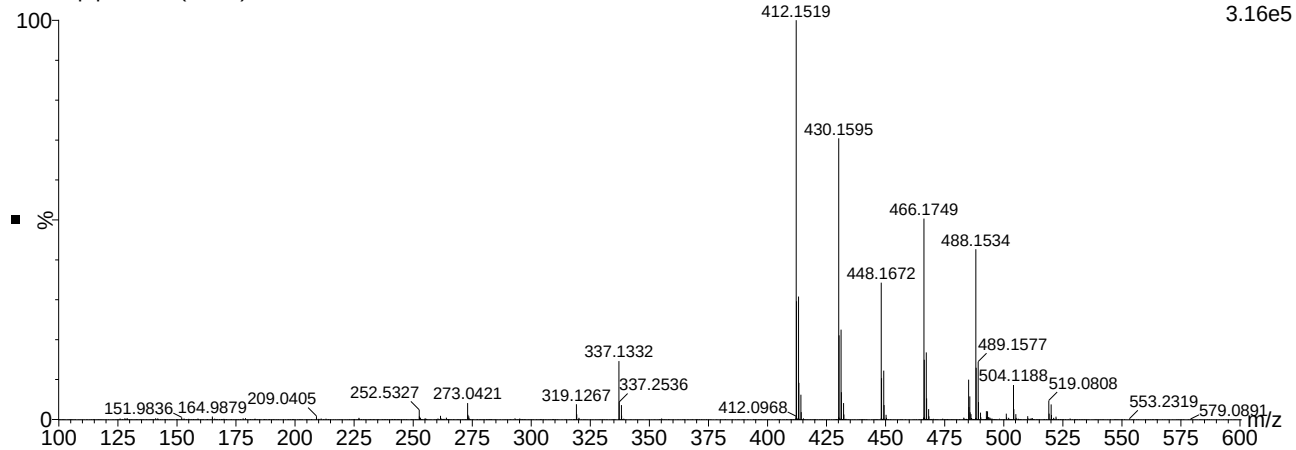




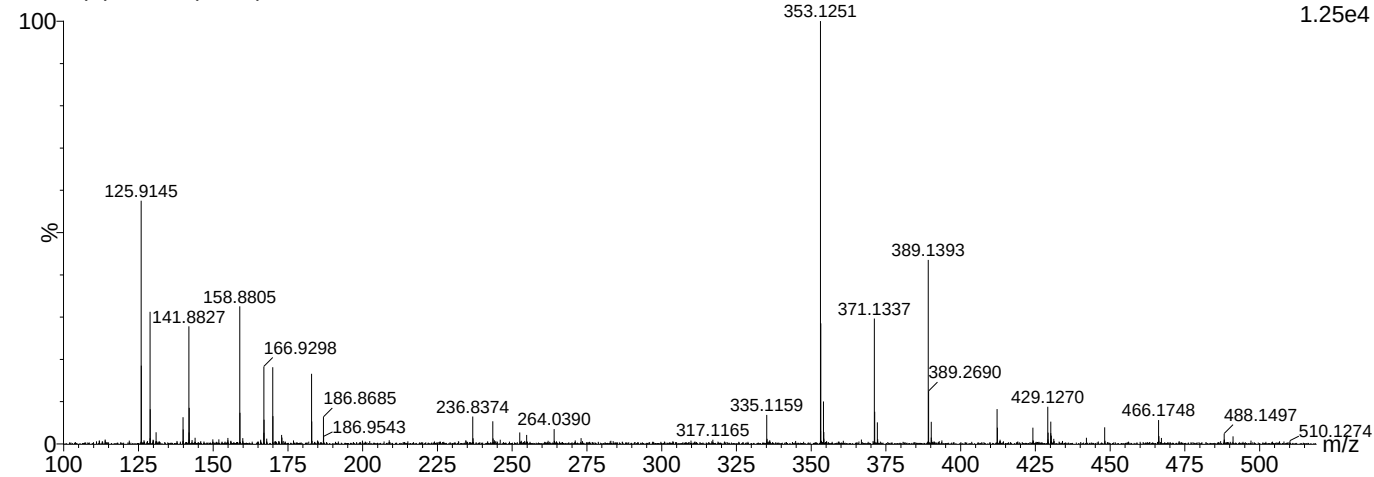
LFD rep 833 (3.380)



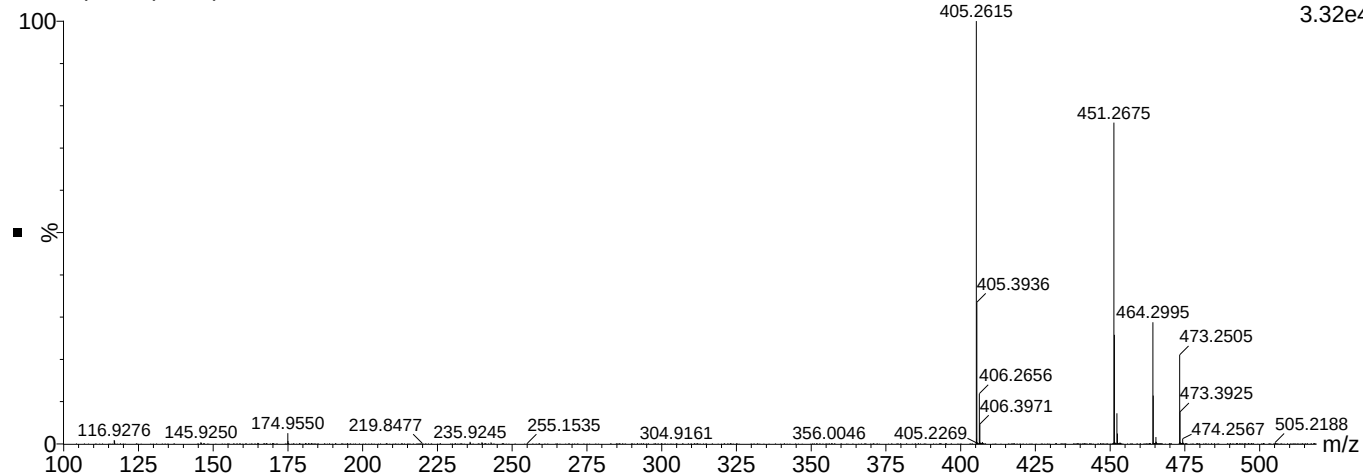
LFD rep pos 834 (3.384)

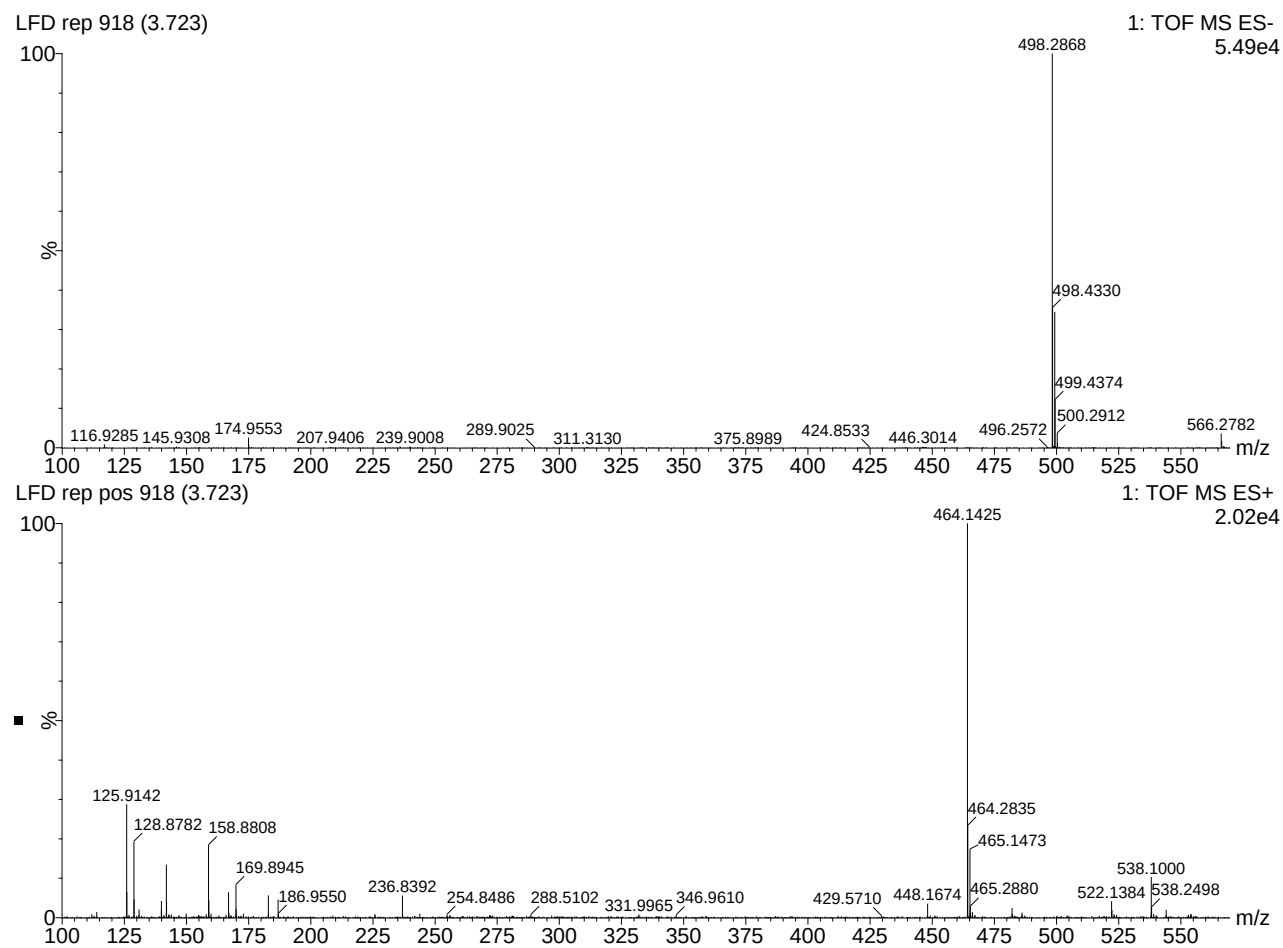


LFD rep pos 862 (3.500)

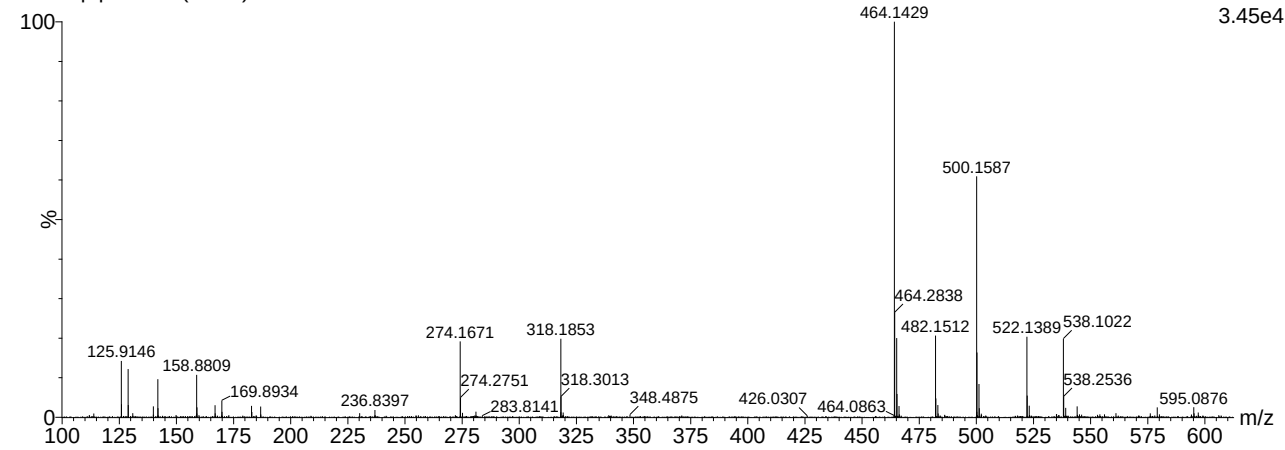
1: TOF MS ES+
1.25e4

LFD rep 858 (3.480)

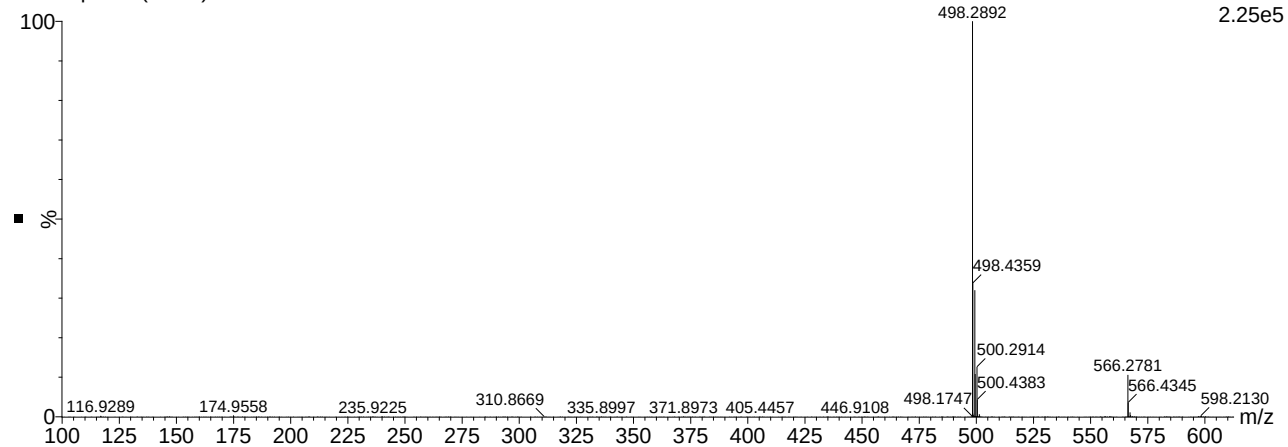
1: TOF MS ES-
3.32e4



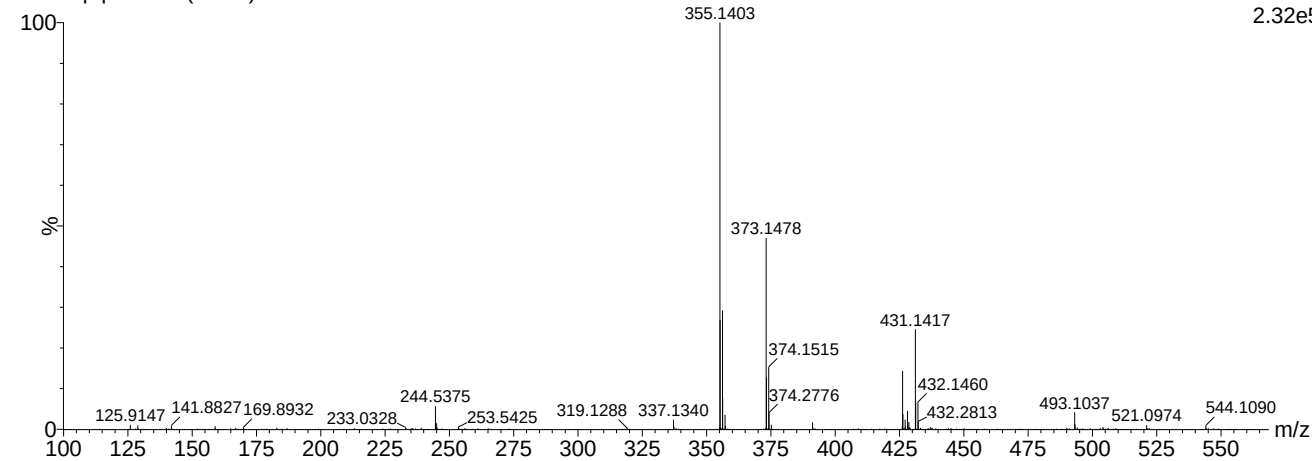
LFD rep pos 954 (3.870)



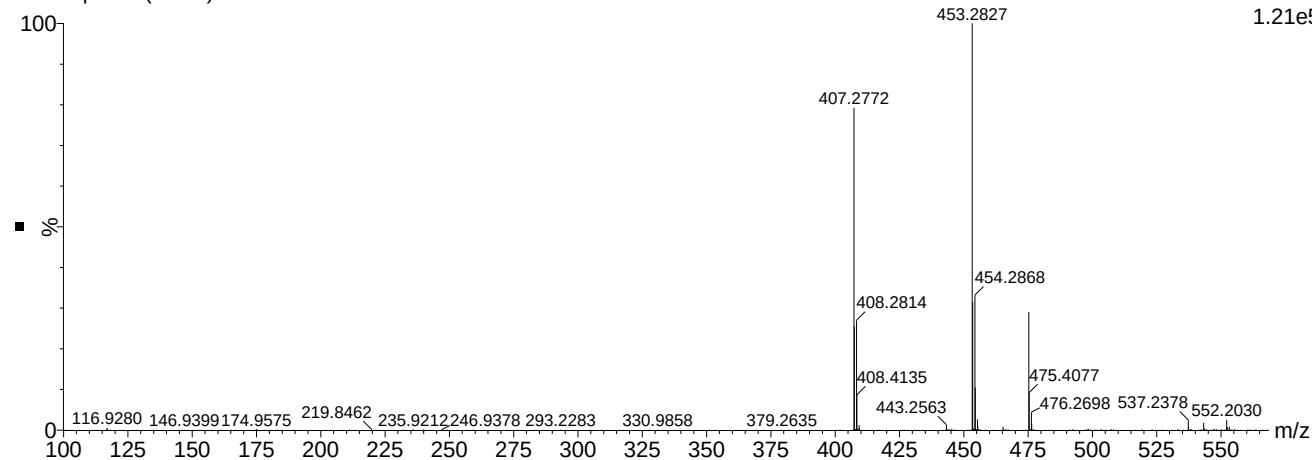
LFD rep 956 (3.877)

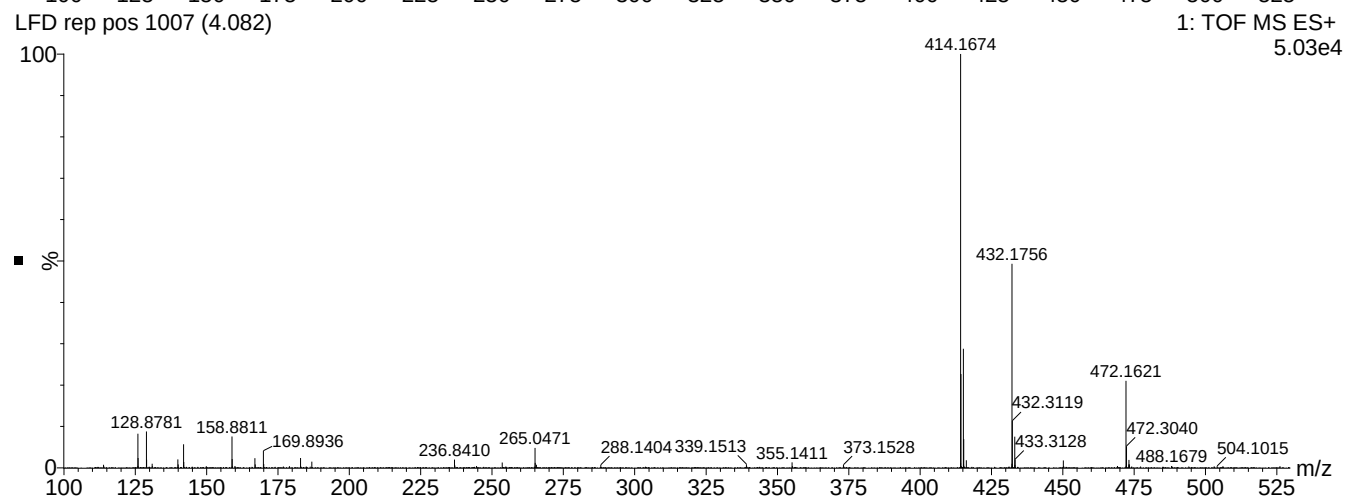
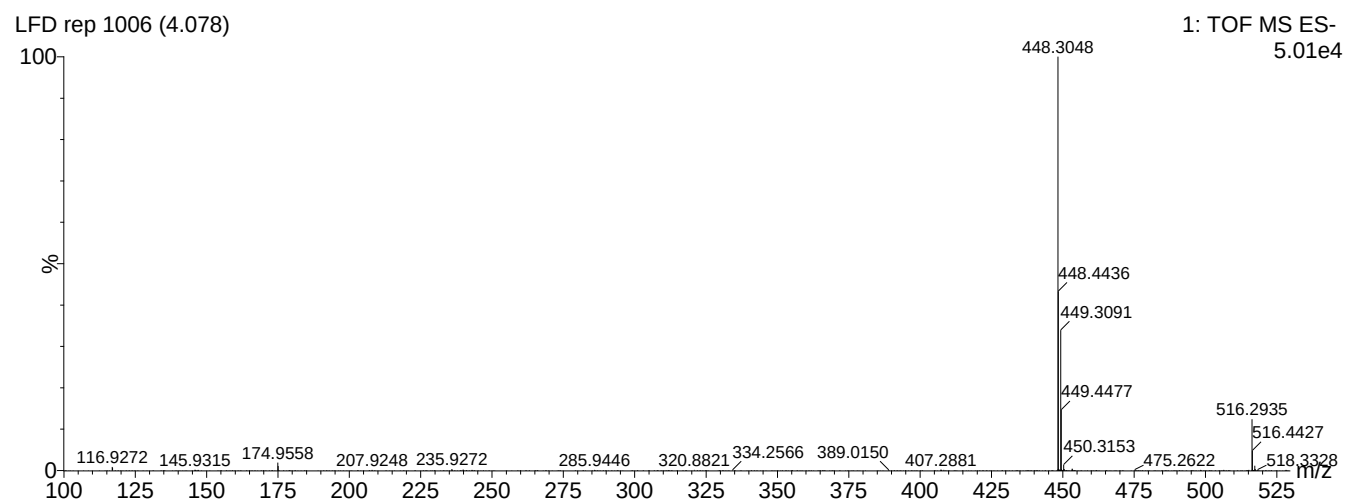


LFD rep pos 980 (3.974)

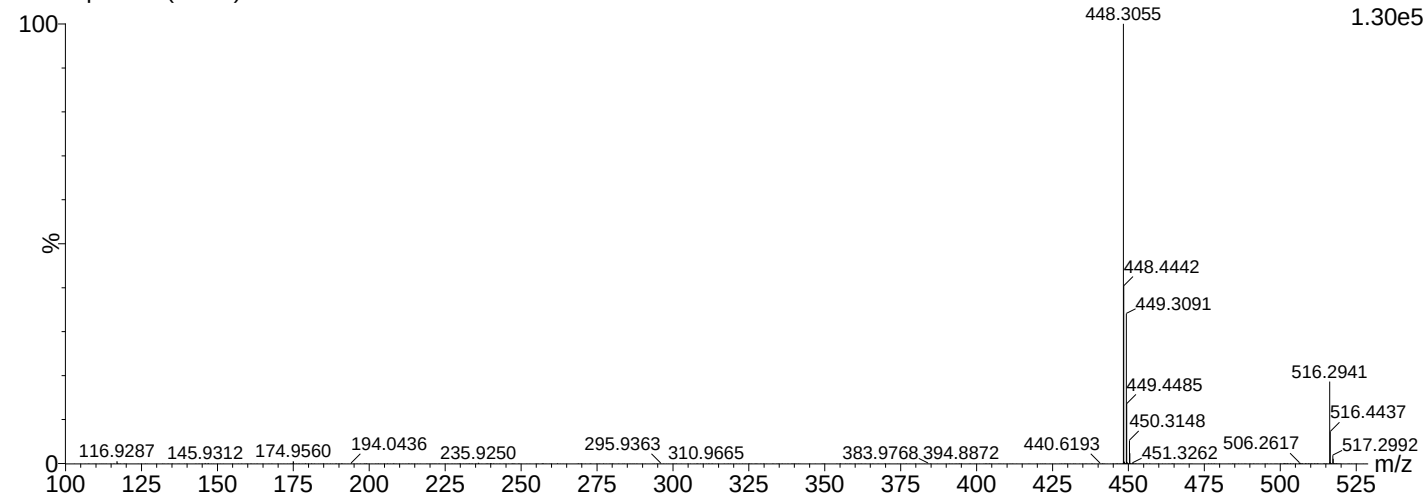
1: TOF MS ES+
2.32e5

LFD rep 983 (3.985)

1: TOF MS ES-
1.21e5



LFD rep 1041 (4.220)



LFD rep pos 1041 (4.221)

